

# Biotechnologie alimentaire

## 1- Introduction

Les enzymes sont des catalyseurs biologiques qui jouent un rôle central dans le monde vivant. Les réactions essentielles pour le fonctionnement d'un être vivant sont trop lentes et sans la présence de ces catalyseurs, la vie telle que nous la connaissons aujourd'hui ne serait pas possible. Qu'il s'agisse de réactions simples comme la formation de bicarbonate à partir d'eau et de dioxyde de carbone ou de réactions complexes comme la réplication de l'ADN, chaque réaction chimique se déroulant au sein d'un être vivant est catalysée par un ou plusieurs enzymes spécifiques. Les enzymes sont des macromolécules, des protéines ou des ARN (les ARN catalytiques sont plus correctement dénommés ribozymes), qui reconnaissent spécifiquement certaines molécules et accélèrent les réactions de transformation de ces molécules suffisamment pour que leur vitesse devienne compatible avec le fonctionnement de l'organisme. Un second rôle essentiel joue par les enzymes est d'assurer le couplage physique entre réactions endergoniques et réactions exergoniques et de permettre ainsi de maintenir les systèmes biologiques dans des états hors d'équilibre, également indispensables pour le maintien de la vie.

L'étude des réactions enzymatiques vise à comprendre les mécanismes réactionnels mais aussi à établir de manière quantitative comment un enzyme est capable d'accélérer spécifiquement une réaction chimique. Puisque les enzymes agissent en modifiant la vitesse des réactions, il est nécessaire d'étudier la cinétique des réactions pour comprendre leur mode d'action.

## 2 – Historique

On considère que les recherches sur la fermentation ont commencé en 1810 lorsque **Joseph Gay-Lussac** a montré que l'**éthanol** et le **CO<sub>2</sub>** sont les produits principaux de la **dégradation du sucre** par les **levures**.

En 1835, **Jacob Berzélius**, dans la première étude théorique générale sur la catalyse chimique, remarqua qu'un extrait de malt appelé **diastase** (on sait maintenant qu'il contient l'enzyme  **$\alpha$ -amylase**) catalyse l'hydrolyse de l'amidon avec plus d'efficacité que l'acide sulfurique.

Au dix-neuvième siècle, **Pasteur** supposa que les être vivants étaient dotés d'une "**force vitale**" qui leur permettait d'échapper aux lois de la nature qui régissent la matière inanimée. D'autres cependant, en particulier **Justus von Liebig**, estimèrent que les processus biologiques sont sous la dépendance de substances chimiques appelées "**ferments**". En réalité, le terme "**enzyme**" (du grec *en*, dans et *zyme*, levure) a été introduit en **1878** par **Frederich Wilhelm Kühne** afin de souligner qu'il existe quelque chose dans les levures, par opposition à la levure elle-même, qui catalyse les réactions de la fermentation. Toutefois, ce n'est qu'en **1897** que **Eduard Buchner** obtint un extrait acellulaire de levures capable d'assurer la synthèse de l'éthanol à partir de glucose (**la fermentation alcoolique**).

**Emil Fischer** découvrit en **1894**, que les enzymes de la glycolyse peuvent distinguer des sucres stéréoisomères, ce qui le conduisit à formuler l'**hypothèse de la clef et de la serrure** : *la spécificité d'une enzyme (la serrure) pour son substrat (la clef) est due à leurs formes géométriques complémentaires*. Cependant, la composition chimique des enzymes ne fut établie avec certitude que dans la première moitié du vingtième siècle. En **1926**, **James Sumner** cristallisa la première enzyme, l'**uréase** du haricot sabre (jack bean), qui catalyse l'hydrolyse de l'urée en  $\text{NH}_3$  et  $\text{CO}_2$ , et démontra que ces cristaux étaient de nature protéique. La nature protéique des enzymes ne fut acceptée par tout le monde qu'au milieu des années **1930**, lorsque **John Northrop** et **Moses Kunitz** mirent en évidence une corrélation directe entre les activités enzymatiques de pepsine, trypsine et chymotrypsine cristallisées, et les quantités de protéines présentes. Depuis, de nombreuses expériences ont démontré que les enzymes sont des protéines.

Notre compréhension de la nature et des fonctions des enzymes est, en grande partie, le résultat de travaux des cinquante dernières années. Ce n'est que grâce à la mise au point de techniques modernes de séparation et d'analyse que l'isolement et la caractérisation d'une enzyme ont cessé d'être un travail gigantesque. Il a fallu attendre **1963** pour que la première séquence en acides aminés, celle de la **ribonucléase A de pancréas bovin**, soit publiée dans son intégralité, et **1965** pour qu'on élucide la première structure d'une enzyme par rayon X, celle du **lysozyme** du blanc d'œuf de poule. Dans les années qui ont suivi, plusieurs milliers d'enzymes ont été purifiées et caractérisées, au moins jusqu'à un certain point, et la vitesse de ces investigations ne fait que s'accélérer.

### 3 - Définition d'un enzyme

Les enzymes sont des catalyseurs biologiques de nature protidiques qui interviennent dans toutes les réactions métaboliques énergétiquement possibles qu'elles accélèrent par activation spécifique.

Elles permettent d'atteindre rapidement l'état d'équilibre de la réaction sans le modifier. Ce sont les outils-clés de la biotechnologie et de la bio-industrie. Ce sont elles qui, dans le génie microbiologique, catalysent les réactions métaboliques mises en jeu et assurent leur régulation. Elles ont également conduit le génie génétique à réaliser des modifications de l'équipement enzymatique de certains micro-organismes en vue de les rendre aptes à la biosynthèse de métabolites intéressants.

La connaissance des enzymes, de leur nature et de leurs propriétés, ainsi que de la cinétique des réactions qu'elles catalysent, est donc fondamentale en biotechnologie.

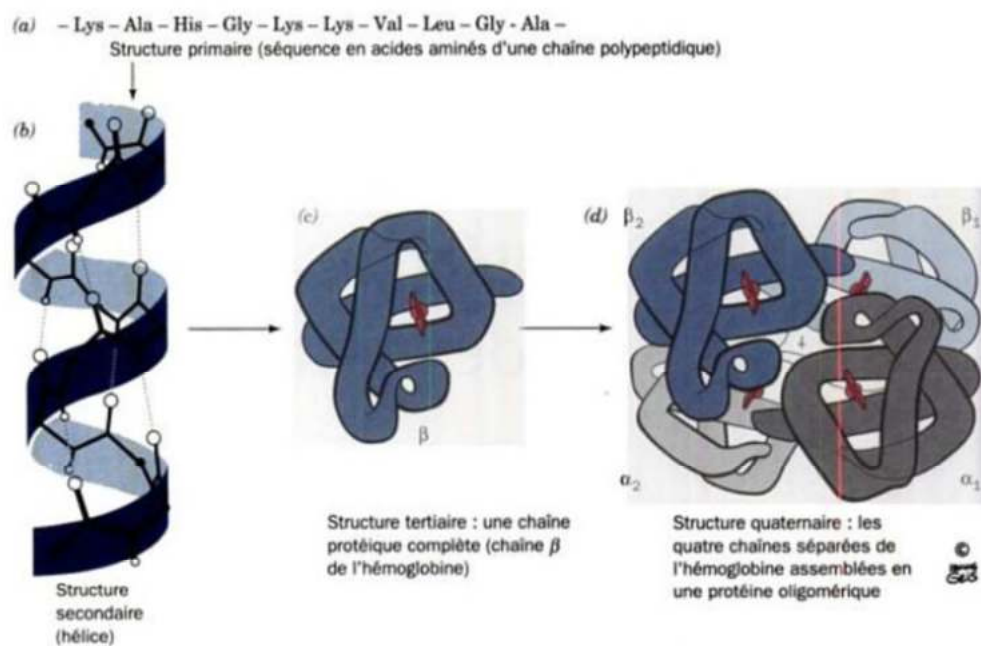
### 4 - Nature des enzymes

Ce sont toutes des macromolécules qui appartiennent à la classe des protéines globulaires. Certaines sont des haloprotéines constituées uniquement d'un enchaînement

d'acides aminés; d'autres sont des hétéroprotéines possédant une partie non protéique, le cofacteur, nécessaire à l'activité catalytique et lié plus ou moins fortement à la protéine.

Les enzymes, catalyseurs biologiques des organismes vivants, sont des macromolécules majoritairement de nature protéique et chirale. Elles sont constituées de plusieurs acides  $\alpha$ -aminés de la série L unis entre eux par une liaison formée par condensation entre le groupement carboxyle d'un acide aminé et le groupement amine d'un autre acide aminé afin de former une liaison amide. Les enzymes sont donc des polypeptides de masses moléculaires élevées entre 10 à 1000 kDa.

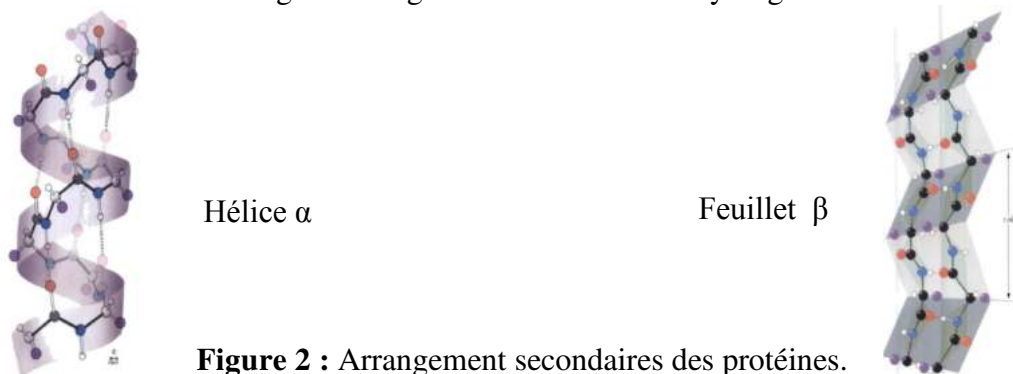
L'ordre dans lequel sont arrangés les acides aminés, constitue ce que l'on appelle la structure primaire des enzymes (figure 1, a).



**Figure 1 : Hiérarchie structurales dans les protéines.**

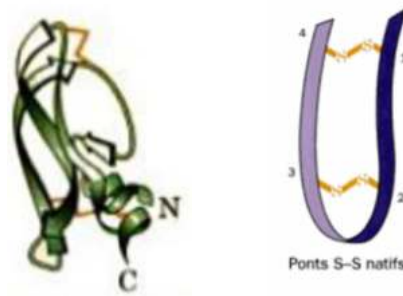
(a) : structure primaire. (b) : Structure secondaire. (c) : Structure tertiaire. (d) : Structure quaternaire

Ces protéines vont avoir tendance à se replier sur elles-mêmes afin de former des arrangements secondaires (figure 1, b) principalement en hélices  $\alpha$  et en feuillet  $\beta$  (Figure 2); cette structure est stabilisée grâce à la génération de liaisons hydrogènes.



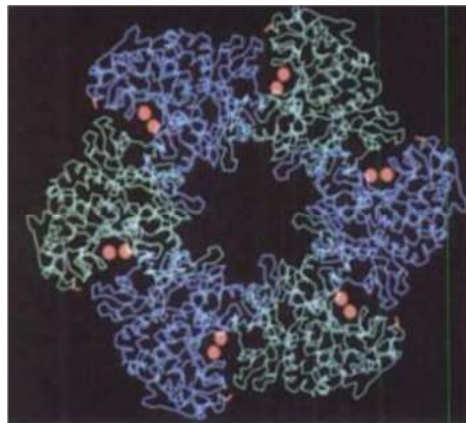
**Figure 2 : Arrangement secondaires des protéines.**

L'arrangement de ces structures secondaires les unes par rapport aux autres forme une structure tertiaire qui, elle, sera stabilisée par des ponts disulfures.



**Figure 3 :** Arrangement tertiaire des protéines.

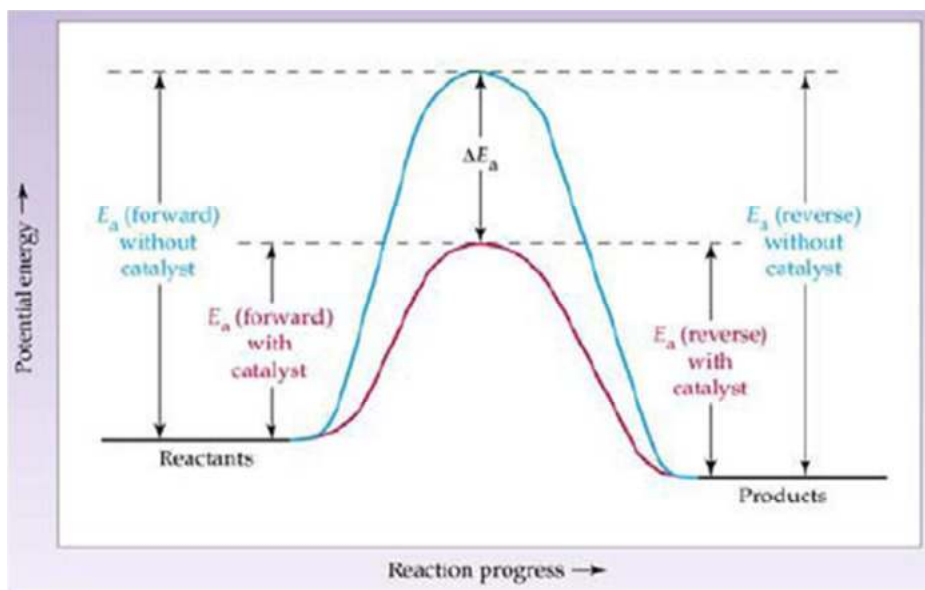
Une structure quaternaire peut même être décrite pour les très grosses enzymes. Cette structure tridimensionnelle de l'enzyme lui donnera sa spécificité permettant à celle-ci de reconnaître un substrat en particulier via une région distincte de l'enzyme, appelée le site actif.



**Figure 4 :** Structure par rayons X de la glutamine synthétase de *Salmonella typhimurium*.

## 5 – La catalyse enzymatique

La catalyse enzymatique repose sur les mêmes principes que les autres catalyses. Un catalyseur, ici l'enzyme, va permettre d'augmenter la vitesse d'une réaction et ce sans modifier les fonctions thermodynamiques de celle-ci. Le catalyseur va permettre d'abaisser l'énergie d'activation de la réaction et d'augmenter le nombre de molécules susceptibles de réagir. En effet, l'état de transition se retrouve à une énergie inférieure, en présence d'enzyme, ce qui a pour résultat d'abaisser l'énergie d'activation.

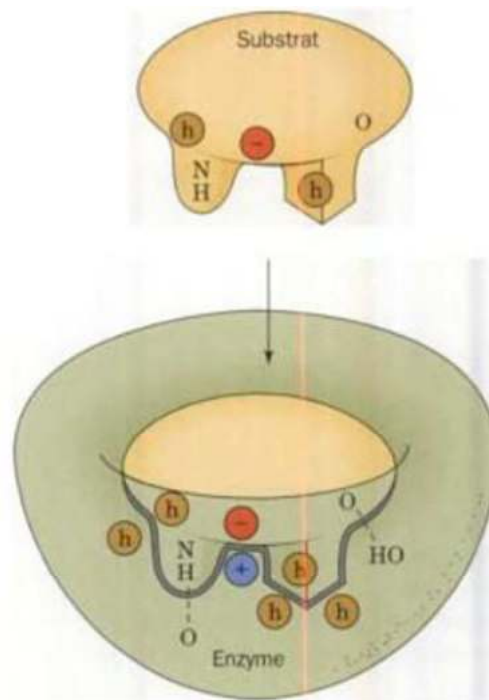


**Figure 5 :** Schéma représentatif de la catalyse enzymatique.

## 6 – Spécificité pour le substrat

*Les forces non covalentes qui permettent aux substrats et à d'autres molécules de se lier aux enzymes sont de même nature que celles qui imposent leurs conformations aux protéines elles-mêmes : forces de van der Waals, interactions électrostatiques, liaisons hydrogène, et interactions hydrophobes.*

Généralement, le site de liaison d'un substrat correspond à une poche ou une crevasse à la surface de la molécule d'enzyme dont la forme est complémentaire à celle du substrat (complémentarité géométrique). De plus, les résidus d'acide aminé qui constituent le site de liaison sont disposés afin d'interagir spécifiquement avec le substrat pour l'attirer (complémentarité électronique). Les molécules qui diffèrent du substrat par la forme ou la distribution de leurs groupements fonctionnels ne peuvent se lier à l'enzyme efficacement ; autrement dit, elles ne peuvent former de complexes enzyme-substrat qui conduisent à la formation de produits. Le site de liaison du substrat peut, en accord avec l'hypothèse de la clef et de la serrure, exister en l'absence de substrat lié, ou il peut se former en même temps que le substrat se fixe à l'enzyme, comme le suggère l'hypothèse de l'ajustement induit. *Des études par rayons X montrent que les sites de liaison du substrat de la plupart d'entre eux sont le siège d'un ajustement induit plus ou moins important lors de la liaison du substrat.*



**Figure 6 : Un complexe enzyme-substrat montrant à la fois les complémentarités géométrique et physique entre enzyme et substrat.** Les groupements hydrophobes sont symbolisés par un h dans un cercle brun et les lignes en pointillés figurent les liaisons hydrogène.

## 7 – Coenzymes

Les enzymes catalysent des réactions chimiques très variées. Leurs groupements fonctionnels peuvent facilement participer à des réactions acide-base, établir certaines formes de liaisons covalentes transitoires ainsi que des interactions entre charges. Cependant, elles sont moins enclines à catalyser des réactions d'oxydo-réduction ainsi que des réactions de transfert de groupes. Bien que des enzymes catalysent de telles réactions, elles ne le font qu'en association avec des **cofacteurs**, petites molécules qui sont essentiellement les "dents chimiques" des enzymes.

Les cofacteurs peuvent être des ions métalliques, tels que  $\text{Zn}^{2+}$ , qui est indispensable à l'activité catalytique de la carboxypeptidase A, ou des molécules organiques appelées coenzymes telles que le  $\text{NAD}^+$  pour la YADH. Certains cofacteurs, le  $\text{NAD}^+$  par exemple, ne s'associent que transitoirement à une molécule d'enzyme donnée, si bien qu'ils ont, en fait, un rôle de **cosubstrat**.

Au cours de la réaction à laquelle ils participent, les coenzymes sont modifiés chimiquement. Par conséquent, afin que le cycle catalytique soit assuré, le coenzyme doit revenir à son état initial.

Le complexe enzyme-cofacteur catalytiquement actif est appelé un **holoenzyme**. La partie protéique de l'holoenzyme, enzymatiquement inactive est l'**apoenzyme**; ainsi :



## 8 – Nomenclature des enzymes

Les enzymes sont nommées communément en ajoutant le suffixe –ase au nom du substrat de l'enzyme ou à une expression qui décrit l'action catalytique de l'enzyme. Exp. : l'uréase catalyse l'hydrolyse de l'urée. Cependant, il arrive parfois qu'une enzyme soit désignée par deux noms différents ou, inversement, qu'un même nom désigne deux enzymes différents ou, inversement, qu'un même nom désigne deux enzymes différentes. De plus, beaucoup d'enzymes, par exemple la catalase, qui catalyse la décomposition de  $\text{H}_2\text{O}_2$  en  $\text{H}_2\text{O}$  et  $\text{O}_2$  ont des noms sans aucun rapport avec leur fonction; des termes comme "le vieux ferment jaune" ont même été utilisés à une certaine époque.

Afin d'éliminer cette confusion et de trouver des règles pour nommer rationnellement le nombre sans cesse croissant d'enzymes nouvellement découvertes, l'union of Biochemistry and molecular biology (IUMB) a adopté une règle de classification fonctionnelle et de nomenclature des enzymes.

**Tableau 1** : Classification des enzymes selon la réaction catalysée.

Classification	Type de réaction catalysée
1. Oxydoréductases	Oxydo-réduction
2. Transférases	Transfert de groupements fonctionnels
3. Hydrolases	Hydrolyse
4. Lyases	Elimination de groupements et formation de doubles liaisons
5. Isomérases	Isomérisation
6. Ligases	Formation de liaison couplée à l'hydrolyse de l'ATP

Les enzymes sont classées et nommées en fonction de la nature des réactions chimiques qu'elles catalysent. Il y a six classes principales de réactions catalysées par les enzymes (tableau 1), ainsi qu'un certain nombre de sous classes et de sous classes à l'intérieur de chaque classe. Chaque enzyme se voit assignée deux noms et une classification à quatre chiffres. Son **nom recommandé** est commode pour l'usage quotidien et c'est souvent le nom usuel utilisé précédemment. Son **nom systématique** est utilisé pour éliminer toute ambiguïté; c'est le nom de son (ses) substrat(s) suivi d'un mot se terminant par -ase spécifiant le type de réaction catalysée par l'enzyme qui correspond à la classe principale à laquelle elle appartient. Par exemple, la version la plus récente de la base de données sur la nomenclature enzymatique indique que l'enzyme dont le nom recommandé est carboxypeptidase A porte le nom systématique **peptidyl-L-amino acide hydrolase** et le **numéro de classification** EC 3.4.17.1.

EC est l'abréviation de "**Enzyme Commission**", le premier chiffre (3) indique la classe principale de l'enzyme (hydrolases ; tableau 1), le deuxième chiffre (4) précise sa sous-classe [action sur des liaisons peptidiques (peptidases)], le troisième chiffre (17) désigne sa sous-sous-classe (métallocarboxypeptidases ; la carboxypeptidase A possède un ion  $\text{Zn}^{2+}$  indispensable à son activité catalytique), et le quatrième chiffre (1) est le numéro de série de l'enzyme désigné arbitrairement à l'intérieur de sa sous-sous-classe. Autre exemple : l'enzyme dont le nom recommandé est l'alcool déshydrogénase porte le nom systématique **alcool :  $\text{Nad}^+$  oxydoréductase** et le numéro de classification **EC 1.1.1.1**.

## **9 – Importance des enzymes**

La transformation des produits alimentaires est le premier secteur industriel où l'homme a exploité la catalyse enzymatique, le domaine agroalimentaire offre de multiples et diverses raisons d'utiliser les enzymes. Elles sont essentiellement soit d'**ordre technologique** : accélération ou régularisation de phénomènes enzymatiques, amélioration des qualités technofonctionnelles du produit fabriqué, mise au point de produits nouveaux, valorisation de sous-produits, soit d'**ordre économique** : amélioration des conditions de travail ou de la productivité, régularisation des prix sur le marché.

Les utilisations des enzymes dans le secteur agroalimentaire représentent près de 65 % du chiffre d'affaires du marché des enzymes industrielles et seule une quarantaine d'entre elles est utilisée dans cette industrie

Les enzymes les plus importantes en termes de revenus sont encore les protéases qui couvraient 34,4 % du marché et, elles risquent d'être détrônées par les lipases (38,5 % du marché prévu) qui sont suivies par les glycosidases (30,5 %).

Les principaux acteurs économiques du développement industriel de ces catalyseurs biologiques dans le secteur agro-industriel sont, d'une part, les transformateurs de la production agricole, d'autre part, les concepteurs et réalisateurs de préparations enzymatiques utilisées à l'échelle industrielle. Les gros consommateurs d'enzymes sont l'industrie des détergents, la fromagerie, l'amidonnerie et d'autres industries alimentaires d'origines végétales (secteurs des boissons, boulangerie-pâtisserie, confiserie...).

### **9.1 – Maîtrise des qualités organoleptiques des aliments**

Depuis longtemps les enzymes jouent un rôle important dans les caractéristiques des aliments. Elles agissent :

- soit en étant présentes naturellement dans les matières premières animales (lipase et protéase du lait et de la viande) ou végétales (protéase, oxydase et lipase dans les graines) ;
- soit en provenant de micro-organismes contaminants ou ajoutés sous forme de levain (amylase de levure, lipase et protéase de champignon ou bactérie intervenant dans l'affinage des fromages) ; ces micro-organismes produisent souvent plusieurs enzymes



capables de catalyser une séquence de réactions (par exemple, c'est le cas des préparations de souches aromatisantes) ;

- soit sous forme de préparation purifiée ajoutée à l'aliment ; c'est le cas pour la chymosine, enzyme responsable de la coagulation du lait, pour les pectinases, enzymes permettant de réduire la viscosité des jus de fruits.

Beaucoup d'autres enzymes sont utilisées en technologie alimentaire pour modifier la texture (protéases, amylases...), l'arôme (lipase) ou la saveur (protéase).

Dans de nombreux cas, les modifications sensorielles engendrées par les enzymes sont indésirables soit par la simple présence des produits de la réaction, soit par une quantité excessive de ceux-ci si la réaction est trop prononcée. La maîtrise des propriétés sensorielles passe nécessairement par l'inhibition de certaines activités (traitement thermique de végétaux nécessaire pour détruire les oxydases responsables de brunissement et de défauts de goût) ou par des pratiques technologiques ne favorisant pas les activités enzymatiques indésirables.

## **9.2 Amélioration de propriétés techno-fonctionnelles**

Les enzymes sont utilisées pour maîtriser et/ou pour améliorer les propriétés techno-fonctionnelles des aliments. Dans le tableau 2 sont résumés les effets principaux des activités enzymatiques sur les propriétés fonctionnelles des produits alimentaires.

### **9.2.1 Enzymes de dépolymérisation**

La **protéolyse** limitée permet en général :

- une amélioration de la solubilité des protéines ;
- une diminution de la viscosité et de la fermeté de gels protéiques ;
- un accroissement des propriétés tensioactives des protéines de masse moléculaire élevée pour des degrés d'hydrolyse faibles mais, au contraire, une perte de la capacité stabilisante d'émulsion pour des degrés d'hydrolyse élevés.

L'**hydrolyse** limitée des glycannes (amidon, pectines...) a les effets suivants :

- baisse de rétention d'eau et de viscosité ;
- baisse de fermeté des gels.

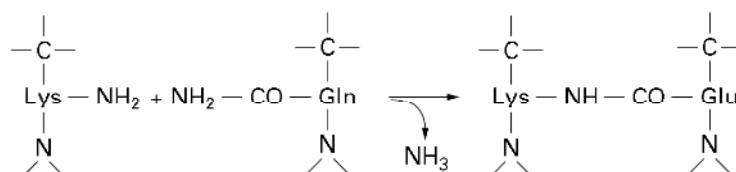
Quant à la **lipolyse**, elle permet, grâce à la libération d'acides gras, d'améliorer les propriétés liantes et émulsifiantes des ingrédients lipidiques.

**Tableau 2 : Effets des activités enzymatiques sur les propriétés fonctionnelles.**

Enzymes		Ingrédients	Effets sur les propriétés fonctionnelles
Hydrolyse des protéines			
Protéases :	- Endocellulaires - Exocellulaires microbiennes	Protéines de muscle (viande, poisson)	Attendrissement, solubilisation Préparation aromatique
Protéases :	- Digestives - Microbiennes - Végétales	Concentrés protéiques, lactosérum Caséine native (micelles) Caséinates Globine du cruor Gluten	Solubilisation, propriétés tensioactives accrues Coagulation présure Propriétés tensioactives accrues Solubilisation et décoloration Solubilisation. Propriétés tensioactives
Protéase en milieu peu hydraté ou avec cosolvant		Caséine, ovalbumine	Réaction « plastéine » → gélification
Phosphatases (microbienne acide et alcaline)		Caséine native	Perte de structure compacte Accroissement de la protéolyse (coagulation)
Phosphatase végétale		Caséine phosvitine	Baisse de sensibilité au Ca <sup>++</sup> et aux cations divalents
Hydrolyse des glycannes			
β-Galactosidase		Lactose → glucose + galactose	Accroissement de la solubilité et du pouvoir sucrant
Invertase		Saccharose → glucose + fructose	Accroissement de la solubilité et du pouvoir sucrant
α et β-Glucosidase		Glycoprotéines du blanc d’oeuf	Diminution du pouvoir moussant
Amylases et enzymes débranchantes +		Amidons (maïs, pomme de terre) → maltodextrines, glucose	Baisse de viscosité. Solubilisation → sirops Pouvoir sucrant accru
α-Glucosidase		Concentrés protéiques de légumineuses (féverole)	Élimination de l’amidon Élimination d’α-galactosides
Pectinases Polyméthylestérase + Polygalacturonases microbiennes		Pectines	Déméthylation → accroissement de la dépendance de la gélification vis-à-vis du pH Hydrolyse de liaisons osidiques → baisse de viscosité
Hydrolyse des lipides			
Lipases microbiennes		Triacylglycérols en émulsion	Libération de mono et diacylglycérols tensioactifs Libération d’acides gras volatils (arômes)
		Triacylglycérols en cosolvant	Estérification → changement de point de fusion Synthèse de triacylglycérols
Oxydoréductases			
Glucose oxydase		Blanc d’œuf (élimination du glucose)	Poudre insensible aux réactions de Maillard
		Acide linoléique	Composés odorants (aldéhydes, lactones)
		Concentrés protéiques contaminés par lipides insaturés	Perte de solubilité
Enzymes de synthèse			
phosphokinase		Caséines et protéines diverses	Gélification en présence de Ca <sup>++</sup>
transglutaminase		Protéines → polymérisats	Gélification
cyclodextrineglucanotransférase		Maltodextrines → cyclodextrines	Encapsulats de molécules hydrophobes

## 9.2.2 Enzymes de polymérisation

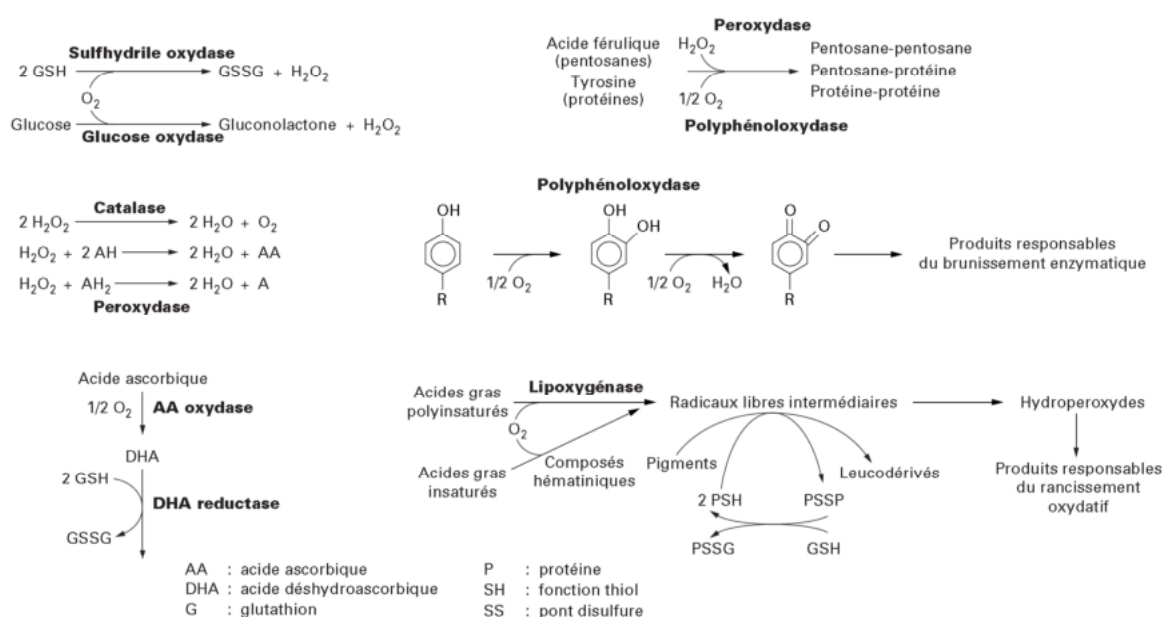
La transglutaminase (E.C.2.3.2.13) a été utilisée pour former des ponts covalents entre groupes amides de l'asparagine et la glutamine et groupe  $\epsilon$  lysyle :



Cette réaction, mise en œuvre dans les cellules vivantes et dans une étape terminale de la coagulation sanguine, peut conduire à d'énormes édifices polypeptidiques qui sont aptes à fixer beaucoup d'eau et à inclure des petites molécules. Selon le degré de réticulation, on obtient un accroissement de la viscosité et même une gélification de solutions. C'est ainsi que les protéines de soja, de blé, les caséines, la myosine sont utilisées pour former des films, des gels et stabiliser des émulsions.

## 9.2.3 Oxydoréductases

Elles jouent un rôle essentiel dans les industries de cuisson des céréales. La figure 7 représente précisément les principaux systèmes d'oxydoréduction intervenant en agroalimentaire. Leur action peut se résumer en quelques lignes. Par la production de radicaux libres, l'oxydation des lipides insaturés ou d'autres substrats oxydables (polyphénols, par exemple) provoque généralement des réactions de polymérisation des protéines (formation de ponts disulfure ou de ponts carbonylamine) avec une perte de solubilité et d'une grande partie des propriétés tensioactives.



**Figure 7 :** Schéma des principaux systèmes d'oxydoréduction intervenant en agroalimentaire.

#### 9.2.4 Enzymes de modification de chaînes latérales de macromolécules

Les pectinéméthylestérases (E.C.3.1.1.11) associées aux pectinases hydrolysent les fonctions esters des pectines dont elles modifient le degré de méthylation ; cette réaction aboutit en général à des degrés de méthylation compris entre 10 et 30 % et modifient ainsi le phénomène de gélification et les conditions optimales de pH et de composition minérale ( $\text{Ca}^{++}$ ) qui y sont reliées.

La phosphorylation et la glycosylation enzymatiques sont applicables aux protéines alimentaires mais la spécificité des conditions réactionnelles est si stricte qu'elle limite leur rôle.

La déphosphorylation des caséines par des phosphatases acides ou alcalines augmente fortement la stabilité d'émulsion sans différence significative de viscosité. De plus, au cours de l'affinage des fromages, des phosphatases pourraient intervenir dans la déphosphorylation des caséines les rendant ainsi plus hydrolysables par les enzymes protéolytiques.

Les protéases telles que la papaine peuvent avoir une activité acylante en introduisant des groupements thiol dans les protéines de soja ; il en résulte une modification des propriétés fonctionnelles.

### 9.3 Applications dans les filières agroalimentaires

Les enzymes endogènes et/ou exogènes peuvent contribuer à l'élaboration de la texture (coagulation du lait) ou à son évolution dans le processus de maturation (viande, poisson, fruits, légumes), d'affinage (fromage, saucissons secs...).

Les produits des réactions enzymatiques peuvent intervenir directement ou indirectement par apport de précurseurs sur la saveur et l'arôme des produits finis.

#### 9.3.1 Filière laitière

La première étape de la transformation du lait en fromage est la coagulation. Quand elle s'effectue par la voie enzymatique, elle résulte d'une déstabilisation de la fraction caséinique par hydrolyse spécifique de la caséine (liaison Phe105Met 106) sous l'action de chymosine (E.C.3.4.23.4). Dans la présure extraite de la caillette de veau nourri au lait, cette enzyme se trouve en compagnie d'une autre protéase coagulante : la pepsine (E.C.3.4.23.1-2).

Pour pallier aux déséquilibres de l'offre et de la demande en matière de présure de veau, différentes solutions ont été proposées : à savoir, la mise en œuvre de protéases d'origine animale (pepsine bovine, pepsine porcine), d'origine végétale (*Cynara cardunculus*), d'origine microbienne (*Endothia parasitica*, *Mucor pusillus*, *Mucor miehei*) ou l'utilisation de chymosine recombinante. Cette protéase produite chez *Kluyveromyces lactis*, *Escherichia coli* ou *Aspergillus niger* est autorisée en remplacement de la présure de veau dans certains pays.

La mise en œuvre de substituts de chymosine a des répercussions à la fois sur la texture, le rendement fromager et l'affinage. Leurs spécificités enzymatiques sont, en effet, différentes

de celles de la chymosine ; de plus, leur rétention dans le caillé lors de l'égouttage est inférieure à celle de la chymosine. Par contre, la chymosine recombinante a des caractéristiques physico-chimiques et des propriétés coagulantes identiques à celle du veau.

Le choix de l'enzyme coagulante est une décision importante qui appartient au fromager. La sélectivité de la coupure de la caséine K assure en effet l'intégrité des protéines pendant cette transition délicate du lait liquide au coagulum. Une enzyme trop peu sélective risque de continuer à hydrolyser les caséines pendant la phase de coagulation. On risque alors de perdre des fractions azotées dans le lactosérum.

Ce risque est majeur : il détermine le rendement fromager, c'est-à-dire le nombre de kilogrammes de fromages que l'on obtient pour 100 kilogrammes de lait mis en oeuvre. C'est un critère principal de la réussite économique de la transformation fromagère. En perdant un pour cent de rendement, on remet en cause la rentabilité globale du processus de transformation du lait en fromage. Cela justifie le fait que l'on juge d'abord les enzymes coagulantes sur leur aptitude à préserver les rendements.

La texture, la saveur et l'arôme du fromage sont la résultante de modifications physico-chimiques des fractions protéiques et lipidiques consécutives à l'action des enzymes et des micro-organismes.

Les protéases et les lipases impliquées dans le déroulement de l'affinage sont :

- présentes dans le lait : plasmine (E.C.3.4.21.7) ;
- apportées par les agents coagulants : chymosine, lipases ;
- secrétées ou libérées par les micro-organismes : levain, flore secondaire.

En ce qui concerne la chymosine, dans les fromages à pâte cuite, de type emmental, comté, beaufort, grana, parmesan..., l'enzyme coagulante n'intervient pas ou de façon marginale dans la protéolyse pendant l'affinage. Le chauffage du caillé en cuve autour de 53 °C inactive, en effet, en très grande partie cette enzyme. Pour les autres fromages (par exemple, type pâte pressée : gouda, cheddar...), la chymosine coupe la caséine  $\kappa$  dans la première phase de la protéolyse pendant l'affinage. Cette activité protéolytique jouera un rôle majeur sur la formation de la texture et du goût du fromage prêt à la consommation.

L'ensemble des enzymes susceptibles de jouer un rôle dans le déroulement de l'affinage est de mieux en mieux connu. De nombreuses études ont été réalisées pour tenter d'accélérer le déroulement de l'affinage, pour en réduire les coûts, notamment dans le cas de pâtes pressées.

Plusieurs voies sont envisagées :

- addition directe d'enzymes (protéases et lipases) dans le lait ou le caillé sous forme libre ou encapsulée (liposomes) ;
- lyse des micro-organismes du fromage (lysozyme-lysine phagique) pour libérer leur contenu enzymatique ;

- surexpression des activités protéolytiques-peptidasiques des micro-organismes (levains).

Les effets les plus marquants de cette addition d'enzymes sont obtenus avec les lipases. L'hydrolyse des acylglycérols conduit en effet à des acides gras qui ont une action importante sur les caractéristiques olfactives de certains fromages - et notamment les pâtes persillées (roquefort, bleu des Causses, bleu d'Auvergne...) – par suite de leur transformation en cétoacides, méthylcétones, lactones.

De même, l'addition de lipases à du lait de vache peut générer des saveurs proches de celles obtenues à partir de lait de chèvre et de brebis. Celles-ci sont utilisées en fabrication de fêta, manchego et romano à partir de lait de vache. La note de fromage bleu peut être également renforcée par certaines lipases. Dans le cas de certains fromages (ras-kopaniste), l'apport de lipases à du lait pasteurisé permet d'obtenir des saveurs proches de celles obtenues à partir du lait cru.

En résumé, l'importance des acides gras libres dans la saveur caractéristique de différents produits laitiers n'a cessé de croître. Certains acides gras, comme les acides caproïque (C6 :0), caprylique (C8 : 0) et caprique (C10 : 0) donnent un goût piquant, poivré au fromage. Les lipases actives dans les fromages « italiens » (provolone, romano...) sont traditionnellement dérivées de caillettes des jeunes veaux ou d'agneaux.

### **9.3.2 Produits carnés**

Les enzymes protéolytiques musculaires jouent un rôle très important dans le processus d'attendrissage des viandes. Elles sont en effet responsables des altérations structurales et biochimiques des muscles conduisant à une fragilisation de ce tissu et, par voie de conséquence, à l'amélioration de sa tendreté, qualité la plus recherchée par le consommateur. La variabilité importante de cette qualité, qui a pour origine une grande diversité des matières premières, a conduit les industriels à s'intéresser aux technologies d'attendrissage « artificiel » des viandes et, plus particulièrement, à celles qui font appel à des enzymes exogènes comme la papaïne (E.C.3.4.22.2), la ficine (E.C.3.4.22.3) ou les collagénases (E.C.3.4.24.3). Selon le but recherché (attendrissage de muscles plus ou moins riches en collagène, amélioration de morceaux susceptibles d'être ensuite consommés en steak ou bouillis, uniformisation de la tendreté de viandes à griller...), l'une ou l'autre ou un mélange adapté de ces protéases sera utilisé.

En plus des mécanismes physico-chimiques de maturation des viandes, des réactions enzymatiques agissent de façon synergique.

Trois systèmes protéolytiques ont été identifiés au niveau du tissu musculaire :

- les protéases neutres calcium dépendantes appelées calpaïnes (E.C.3.4.22.17) actives à pH neutre ;

- les protéases lysosomales désignées sous le nom de cathepsines (B,D, L et H) actives entre pH 4,0 et 6,0 ;
- le complexe multicatalytique appelé protéasome.

Une majorité des modifications qui ont lieu au niveau de la structure myofibrillaire est due à l'action synergique des calpaïnes et des cathepsines, chacun des deux types de protéases étant incapable d'engendrer séparément toutes ces variations.

La maturation des viandes est fortement dépendante de la température. Ainsi, entre 0 et 40 °C, le coefficient de température ou Q10 est très élevé et voisin de 2,5. Cela signifie que chaque fois que la température est abaissée de 10 °C, la vitesse d'attendrissage est divisée par 2,5. En fait, cette relation n'est pas aussi simple puisque non linéaire sur toute la plage de température.

L'attendrissage artificiel n'offre d'intérêt que pour la viande bovine car les viandes de porc, d'agneau ou de volaille sont généralement suffisamment tendres du fait de l'âge d'abattage de ces animaux qui est physiologiquement très bas.

L'attendrissage enzymatique de la viande grâce à l'action de protéases exogènes d'origines diverses est interdit en France au niveau industriel. Seule l'utilisation de sels attendrisseurs est autorisée et cette autorisation ne concerne que la papaïne, enzyme extraite de la papaye.

Le sel attendrisseur à base de papaïne est exclusivement réservé à la consommation domestique avec une proportion de papaïne comprise entre 20 et 30g/kg de sel de cuisine. Par contre, l'utilisation d'extraits de fruits (papaye, ananas) est autorisée. L'effet attendrisseur de ces extraits bruts est réel mais la maîtrise du degré d'attendrissage est délicate, voire impossible.

Compte tenu que la viande est généralement stockée à basse température, ces protéases ne seront pleinement actives que lors de la cuisson et leur efficacité sera bien entendu d'autant plus grande quela montée en température sera lente. Pour la papaïne, l'optimum d'efficacité est atteint aux environs de 40-50 °C et son activité ne cessera qu'après dénaturation de l'enzyme elle-même par la chaleur, dénaturation qui intervient aux environs de 75-80 °C. Pour cette raison, les sels attendrisseurs sont ajoutés à la viande juste avant cuisson.

Bref, l'attendrissage enzymatique des viandes présente un intérêt sur le plan industriel et le seul facteur limitant au développement de cette technologie reste la législation. Cette dernière est d'ailleurs en cours de renégociation au niveau européen. L'état actuel de la réglementation fait que très peu de travaux de recherches sont actuellement réalisés dans ce domaine. Les principaux résultats ont été obtenus aux États-Unis où la réglementation est beaucoup plus souple.

### **9.3.3 Produits de la mer**

Les produits de la mer (poissons, crustacés, mollusques et algues) ont été transformés depuis des siècles en utilisant les activités d'enzymes endogènes ou exogènes. Comme la chair de

poisson constitue une source de protéines de haute valeur nutritive, les « faux-poissons », les farines brutes ainsi que les sous-produits constituent donc une réserve importante de protéines susceptibles d'être consommées après transformation par hydrolyse enzymatique.

Dans les hydrolysats qui constituent aujourd'hui, au niveau commercial, le plus important procédé enzymatique de transformation du poisson, il convient de distinguer, d'une part, les produits traditionnels (autolysats ou hétérolysats) et, d'autre part, les hétérolysats industriels dont la finalité est de modifier les matières protéiques disponibles afin de leur apporter une valeur ajoutée nutritionnelle et économique.

Une revue récente a recensé l'abondante littérature qui décrit les techniques de production des différents produits traditionnels fermentés ou maturés. Toutes ces préparations obéissent au besoin impératif de contrôler la prolifération bactérienne en additionnant du sel et/ou du saccharose, en jouant sur le pH, la force ionique et le potentiel rédox ; il en résulte une faible vitesse de l'autolyse et une durée longue des procédés (généralement 6 mois).

Dans les procédés traditionnels, la majeure partie de la transformation est due aux enzymes endogènes, essentiellement les protéases digestives. Afin d'abaisser les coûts de production, l'utilisation d'enzymes végétales (bromélaïne, papaïne et ficine) a été préconisée pour la fabrication d'une sauce de poisson de faible goût pouvant être ajoutée à la sauce traditionnelle (nam-pla). C'est la bromélaïne qui (concentration 0,8 % en masse ; cofacteur cystéine 0,025M, 33 °C) donne les meilleurs résultats et permet d'obtenir en 21 jours un produit de qualité satisfaisante au goût amer peu prononcé.

Au cours du procédé d'anchoitage (préparation d'un anchois salé et mûré), la forte teneur en sel du milieu, les faibles valeurs de l'activité de l'eau (0,7-0,8) et du pH (autour de 5) inhibent la croissance de bactéries d'altération. L'hydrolyse des tissus est due quasi exclusivement aux protéases endogènes et les composés volatils caractéristiques sont des cétones et des alcools produits par l'activité de ces biocatalyseurs endogènes et des dérivés d'aldéhydes auto-oxydés.

Les pulpes, les farines et les concentrés protéiques de poisson sont couramment employés en nutrition animale ; ils sont peu solubles et possèdent de faibles propriétés nutritionnelles. La production d'hydrolysats protéiques de poisson permet de mieux valoriser ces produits en les destinant à l'alimentation humaine (arômes, compléments protéiques). L'hydrolyse est effectuée par ajout au produit à transformer de protéases exogènes, essentiellement d'origine microbienne et il faut éviter la formation de petits peptides amers.

L'ensilage de poisson peut être une alternative à la production de farine de poisson car la séparation de l'huile est effectuée après hydrolyse enzymatique et/ou chimique au lieu d'un procédé thermique et mécanique. Les ensilages sont préparés à partir de poissons broyés qui sont hydrolysés après acidification du milieu (pH égal à environ 4,5) et par inoculation de bactéries lactiques. La bonne qualité nutritionnelle et l'effet probiotique des ensilages permettraient leur utilisation pour l'élevage de porcs.



Les enzymes mises en jeu lors de la préparation des hydrolysats sont soit d'origine endogène, soit produites par les bactéries présentes dans le milieu, soit d'origine commerciale.

Certaines enzymes endogènes digestives présentent des propriétés originales (par exemple, une activité importante à 4 °C). De même, les bactéries présentes dans les sauces de poisson orientales croissent jusqu'à des concentrations de NaCl de 4M et présentent des activités enzymatiques de type lipase, gélatinase et caséinase. En général, les protéases issues des bactéries halophiles sont actives à des concentrations en NaCl élevées mais sont dénaturées à des concentrations en sel inférieures à 2 ou 3M.

Répetons que la cinétique d'autolyse des produits de la mer est un processus lent et l'addition de protéases exogènes permet de réduire le temps de maturation et donc les coûts de production.

Dans cette filière comme dans les autres, la spécificité de substrat peut être considérée comme le premier critère de choix d'une enzyme, à côté d'autres facteurs comme le pH<sub>0</sub>, la thermostabilité, la présence d'activateurs et d'inhibiteurs, le prix et la disponibilité du catalyseur.

*Exemple : les protéases les plus couramment utilisées sont extraites à partir de sources essentiellement microbiennes (monozyme, pronase...), mais aussi animales (pepsine) et végétales (papaine, ficine, bromélaïne).*

#### 9.3.4 Industries végétales

Étant donné la prépondérance et la diversité des macromolécules végétales dans le monde vivant, les possibilités d'applications des enzymes pour transformer et modeler les matières premières végétales sont innombrables. Mais il existe quelques limites dans la mise en œuvre des enzymes sur des substrats végétaux.

➤ L'utilisation de différentes enzymes permet d'améliorer la qualité des produits de **boulangerie** et de **pâtisserie**.

- En premier lieu, l'apport d' $\alpha$ - et  $\beta$ -amylase à la farine de blé permet d'accroître un peu la teneur en oses libres fermentescibles (en moyenne de 1 à 2 % dans la plupart des farines). Cet apport permet une **meilleure fermentation** avec production de gaz et un bon gonflement de la pâte boulangère : on obtient des pains bien lacunaires, non collants. De plus, on peut déterminer la proportion de dextrines produite en réglant le rapport  $\alpha/\beta$  des amylases de la farine. On limite ainsi la réaction de Maillard à la cuisson et on obtient des croûtes ni trop épaisses, ni trop colorées.
- La maîtrise du **rassissement** du pain peut être acquise également par un apport enzymatique. Rappelons que le rassissement est dû à la rétrogradation de l'amylose et de l'amylopectine de la forme soluble hydratée en des formes cristallines pauvres en eau : le pain devient dur et cassant et perd toute qualité. Une solution classique consiste à ajouter des tensioactifs empêchant ce phénomène sur l'amylose ; l'emploi

d'un monoacylglycérol (ou un analogue structural) qui occupe le centre de l'hélice de cette fraction de l'amidon retarde le rassissement. Mais un apport d' $\alpha$ -amylase raccourcit les chaînes d'amylopectine les ramenant de 19-21 unités à 12-15 unités glucose. Ce changement de taille diminue la tendance à la rétrogradation et surtout la taille de cristaux qui peuvent se former. La durée de vie du pain s'en trouve prolongée.

- L'hydrolyse partielle des constituants du gluten par un apport de protéases bactériennes avant la formation de la pâte coupe certaines liaisons endopeptidiques, ce qui **réduit l'élasticité** et **améliore l'extensibilité** de la pâte ; en conséquence, le pétrissage mécanique devient plus efficace car la déchirure de la pâte ne se produit plus. Cette technologie est utilisée dans l'industrie des crackers. De même, avec certaines exopeptidases fongiques, on accroît la libération d'acides aminés, modulant ainsi la réaction de Maillard, donc ses conséquences sur la flaveur du pain, la consistance et la couleur de la croûte.
- En **panification**, l'emploi des hémicellulases s'est largement répandu ces dernières années. Précisons tout d'abord que le terme « hémicellulase » est une appellation générique qui recouvre une grande diversité d'enzymes dégradant des polysaccharides de la paroi cellulaire des végétaux. En pratique, les hémicellulases jouant un rôle en panification ont essentiellement comme substrat les pentosanes des farines. Les farines de blé contiennent en effet entre 2 et 3 % de pentosanes constitués principalement de D-xylose et de Larabinose.

En conséquence, les enzymes efficaces sont principalement des endoxylanases (E.C.3.2.1.32). Ajoutées à une dose optimale aux farines (entre 50 et 100 ppm), ces biocatalyseurs convertissent en partie les pentosanes insolubles, à caractère défavorable pour la qualité boulangère, en pentosanes solubles qui sont eux bénéfiques. Cela se traduit par une amélioration des caractéristiques de pâte (extensibilité, élasticité, collant) et de pain (volume, aspect, mie). En cas d'addition excessive, une trop forte proportion de pentosanes est dégradée ce qui rend les pâtes molles et collantes.

Les systèmes d'oxydoréduction intervenant en panification sont schématiquement dans la figure 2. La lipoxygénase (E.C. 1.13. 11. 12), qui catalyse l'oxydation moléculaire des acides gras non estérifiés, joue un rôle majeur, quoique indirect, dans les modifications conformationnelles des micelles lipoprotéiques assurant l'agrégation des protéines entre elles pour former le gluten. L'activité de cette enzyme est faible dans la farine de blé, elle est considérablement plus élevée dans les farines de légumineuses. À noter également que cette enzyme ne figure pas sur la liste des enzymes autorisées en industrie alimentaire.

La farine contient également une acide ascorbique oxydase (E.C. 1.10.3.3.). Elle catalyse l'oxydation par l'oxygène moléculaire de l'acide L-ascorbique (additif couramment utilisé en panification) en acide L-déshydroascorbique. Ce dernier oxyde le glutathion en présence de glutathion déshydrogénase (E.C. 1.8.5.1). Le glutathion oxydé devient alors indisponible pour

participer aux réactions d'échange de ponts disulfures avec les protéines ; il en résulte un raffermissement de la pâte.

Parmi les autres oxydoréductases présentes dans la pâte, il convient de mentionner :

- les polyphénoloxydases (E.C. 1.10.3.1, 1.10.3.2 et 1.14.18.1) qui oxydent les composés phénoliques pour former des quinones, lesquelles, après une série de réactions, conduisent à des polymères colorés en brun ;
  - la glucose oxydase (E.C. 1.1.3.4.) qui catalyse l'oxydation du glucose en D-gluconolactone et eau oxygénée. Cette enzyme n'existe pas dans la farine mais l'utilisation de préparations fongiques de glucose oxydase a été préconisée dans le but de raffermir les pâtes ;
  - la sulfhydryle oxydase (E.C. 1.8.3.2) qui provoque l'oxydation du glutathion réduit en glutathion oxydé tout en produisant de l'eau oxygénée. En outre, des oxydoréductases comme la catalase (E.C. 1.11.1.6) et la peroxydase (E.C. 1.11.1.7) décomposent ce peroxyde d'hydrogène.
- Dans la fabrication de la **bière**, les enzymes utilisées ont pour finalité :
- de suppléer ou de remplacer les enzymes des matières premières (malt, orge cru, grits de maïs, brisure de riz, etc.) en ajoutant généralement un mélange d'a-amylase ou amyloglucosidase + b-glucanase + protéase neutre ;
  - d'améliorer et de régulariser le procédé et la qualité de la bière ; par exemple, l'addition de préparations commerciales contenant des activités b-glucanasiques (extraites de *Penicillium emersonii* car encore actives à 80 °C), seules ou associées à des activités pentosanases, xylanases, arabinases secondaires, permet d'améliorer la filtration de la maïsche et de la bière ;
  - de produire de nouvelles bières ; ainsi l'addition de glucoamylase permet d'obtenir des bières contenant moins d'oligosaccharides résiduels.
- L'irruption des enzymes en technologie des **jus** de fruits et de légumes a profondément modifié les techniques de fabrication dans ce secteur industriel. Et pourtant, des enzymes exogènes sont utilisées dans l'industrie des fruits et légumes depuis plus d'un demi-siècle.
- Les enzymes de **macération** sont caractérisées par leur forte activité polygalacturonase (E.C.3.2.1.15.) et l'absence presque totale de pectine méthylestérase (E.C.3.1.1.11). L'action de ces biocatalyseurs se limite à une hydrolyse partielle des pectines de la lamelle moyenne, suffisante pour dissocier les cellules tout en les conservant intactes en suspension dans un jus rendu visqueux par la présence des pectines solubilisées. Du reste, la charge des pectines solubilisées et dégradées est importante pour la stabilité et la qualité des produits obtenus.

Malgré les nombreuses études effectuées sur la macération enzymatique, elle est encore, pour l'heure, peu pratiquée au stade industriel. En effet, comme la vitesse de la macération décroît au cours du temps, il est presque impossible d'obtenir une macération complète du tissu dans

un temps et avec une concentration en enzyme compatibles avec les contraintes de la production industrielle.

- Bien évidemment, dans le cas de la **liquéfaction** de tissus végétaux, l'hydrolyse de la paroi cellulaire doit être plus importante que lors de la macération. Il s'agit non seulement de désorganiser les tissus, mais également de favoriser l'écoulement du cytoplasme et du contenu vacuolaire.

*Exemple : pour certains fruits mous (fraises, framboises...) une destruction partielle de la pectine facilite le pressurage et augmente la teneur et la quantité de jus ainsi que la présence de pigments anthocyaniques.*

Par conséquent, la liquéfaction la plus performante est obtenue par l'action simultanée des enzymes pectinolytiques et cellulolytiques.

Cependant, le rapport entre les différentes activités et la présence d'hémicellulases contaminantes influent sur le rendement de la liquéfaction et sur la composition en polysides du jus. De plus, l'oxydation des composés phénoliques entraîne la formation de complexes entre pigments et polysaccharides limitant leur dégradabilité.

Ce problème a été résolu soit par addition de polyvinylpyrrolidone insoluble, soit par oxydation-aération (condensation en pigments noirs insolubles).

*Exemple : dans le cas du jus de pomme, la baisse de viscosité est obtenue par une activité combinée de la pectine estérase et de l'endopolygalacturonase sur des pectines hautement estérifiées en solution ; la clarification du jus de pomme est possible avec la pectine lyase (E.C.4.2.2.10), mais cette enzyme est moins efficace dans la clarification du jus de raisin qui contient seulement entre 45 et 60 % de pectines estérifiées. Il faut une concentration préalable (à 45-50 °C) pour arriver à une clarification et dépectinisation complètes.*

Bref, l'enzymage avant pressurage entraîne une baisse de viscosité qui améliore la filtrabilité des jus. Il permet de réduire le temps de filtration lors de la clarification des moûts, ainsi que le temps et l'énergie nécessaires à l'évaporation des jus limpides pour la fabrication des concentrés.

- Les enzymes pectinolytiques sont également utilisées pour valoriser des coproduits dans l'**industrie des fruits**. Ainsi, dans le traitement du citron, les pulpes sont lavées à contre-courant et les pectinases sont ajoutées pour obtenir le maximum de « solides solubles » et la viscosité la plus faible de façon à pouvoir concentrer le produit final. C'est la même démarche qui est utilisée pour produire des quantités importantes de substances capables de donner un trouble dans les boissons produites à partir de différents agrumes.

Ainsi, dans la fabrication des nectars, qui sont des boissons pulpeuses dans lesquelles le jus visqueux maintient une quantité importante de matières en suspension, la meilleure stabilité a

été obtenue dans le cas de fruits tropicaux avec la préparation commerciale la plus riche en pectine méthylestérase, endopolygalacturonase et pectine lyase.

- En résumé, les **préparations enzymatiques commerciales** contenant plus ou moins les activités évoquées ci-dessus sont utilisées pour le **traitement de la pulpe ou du jus**. Elles trouvent leurs applications dans des productions telles que boissons sucrées non alcoolisées à base de fruits ou de légumes, vinification ou cidrerie.

Mais l'optimisation de la liquéfaction de fruits ou de légumes à l'aide de préparations enzymatiques commerciales reste empirique pour une large part. De nombreuses publications et fiches techniques rapportent les meilleures conditions pour la liquéfaction de divers végétaux. En outre, la généralisation de l'utilisation d'enzymes exogènes comme éléments de procédés ne doit pas occulter la présence d'enzymes endogènes.

## 10 – Cinétique enzymatique

Est l'étude des enzymes dans leur fonctionnement. Elle se propose en particulier, d'établir les relations qui existent entre la vitesse de la réaction enzymatique et les concentrations en substrat [S] et en enzyme [E]. Ainsi que l'influence de certains facteurs : pH, température, présence d'effecteurs et éventuellement activité de l'eau.

### 10.1 – Activité enzymatique

La commission sur les enzymes a défini une UI de l'activité enzymatique, le **katal**, quantité d'enzyme qui transforme une mole de substrat par seconde sous des conditions expérimentales standards.

C'est une unité élevée: aussi des sous-multiples du katal sont plus couramment utilisées : microkatal ( $\mu\text{kat}$ ), nanokatal ( $\text{nkat}$ ) et picokatal ( $\text{pkat}$ ) valant respectivement  $10^{-6}$ ,  $10^{-9}$  et  $10^{-12}$  katal ( $\text{kat}$ ).

Les enzymes peuvent se présenter soit sous forme pure, soit sous forme de préparations enzymatiques  $\pm$  purifiée. On rapporte alors l'activité enzymatique à 1 kg de protéines, soit à une moléculegramme: on définit ainsi une activité spécifique, katal / kg de protéines; et une activité molaire, katal/mole d'enz.

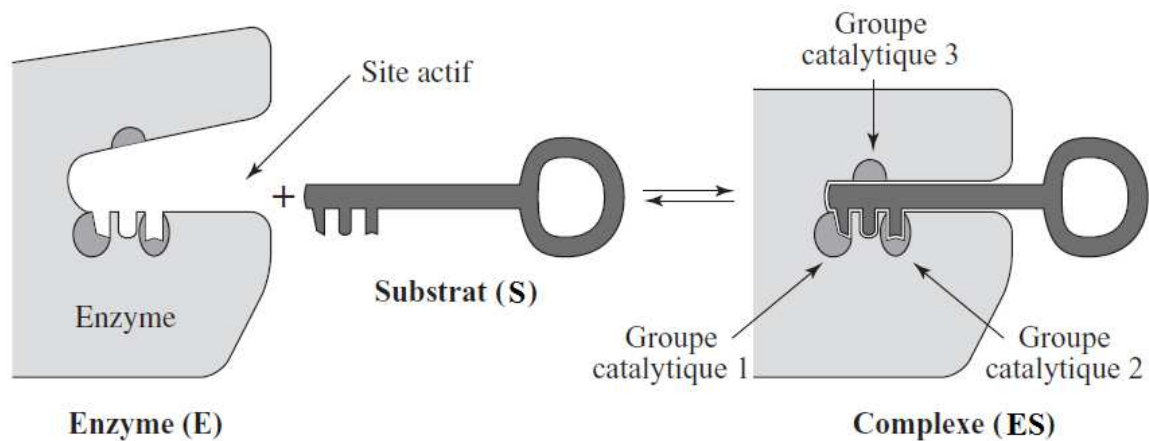
### 10.2 – Enzymes Michaéliennes

#### 10.2.1 – Cinétique à un substrat

##### Principaux faits expérimentaux :

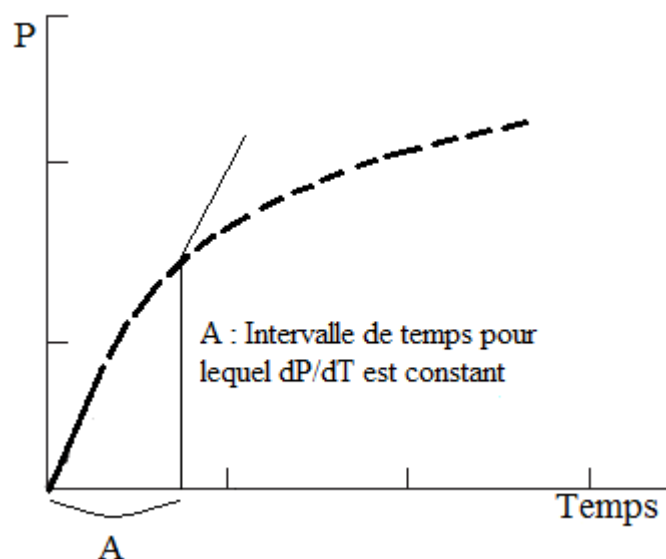
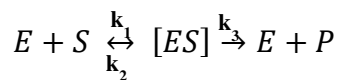
Les 3 principaux faits expérimentaux, à la base des lois générales de la cinétique enzymatiques sont :

- a) Le substrat, S, forme avec l'enzyme, E, un complexe intermédiaire transitoire ES. Ce complexe résulte d'une complémentarité de structure entre le site actif de l'enzyme et la molécule du substrat.



**b)** La vitesse de la réaction au temps  $t$ , c'est-à-dire la vitesse de disparition du substrat,  $-dS/dt$ , ou d'apparition du produit,  $-dP/dt$  qui est représentée par la pente de la tangente à la courbe,  $P$  ou  $S = f(t)$ , n'est pas constante pour des concentrations données en enzyme et en substrat (figure 8), mais diminue en fonction du temps par suite de la disparition du substrat au cours du déroulement de la réaction. Toutefois, en début de réaction, on peut considérer que la tangente à la courbe se confond avec celle-ci et que la vitesse demeure constante.

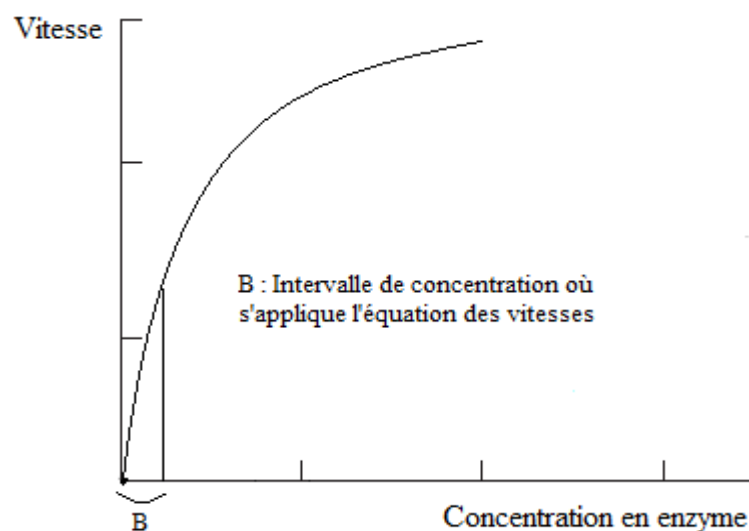
Les études de cinétique enzymatique correspondront donc toujours à cette partie linéaire de la courbe ; ce qui implique de travailler aux vitesses initiales. Dans ces conditions, en début de réaction, la concentration en produit est très faible ; elle peut donc être négligée de même que la réaction inverse de transformation du produit en substrat. On peut ainsi écrire :



**Figure 8:** Courbe d'apparition du produit en fonction du temps.

c) Par ailleurs, pour une concentration donnée de substrat, l'étude des variations de la vitesse initiale de réaction en fonction de la concentration en enzyme (figure 9) montre que cette variation n'est pas linéaire. La courbe présente une allure hyperbolique correspondant au fait qu'au-delà d'une certaine concentration d'enzyme, la totalité du substrat se trouve sous forme de complexe enzyme-substrat ; il en résulte que la vitesse initiale fonction de la concentration en ce complexe demeure constante. Pour les études cinétiques, il est nécessaire la encore de se placer dans des conditions correspondant au début de la courbe, là ou celle-ci est linéaire c'est-à-dire aux faibles concentrations en enzymes.

En d'autres termes, la quantité d'enzyme doit être très petite comparée à la concentration en substrat, de telle manière que la formation du complexe enzyme-substrat, ES, ne modifie pas ou peu la concentration de substrat.



**Figure 9 :** Courbe représentant la vitesse de la réaction enzymatique en fonction de la concentration en enzyme

#### 10.2.1.1 – Hypothèse de MICHAELIS-MENTEN

Dans l'établissement de l'équation des vitesses, MICHAELIS-MENTEN posent comme principe que la vitesse de transformation du complexe ES en E + P est très lente par rapport à la vitesse de la rupture du complexe redonnant E + S.

Cette hypothèse signifie que  $k_3 \ll K_2$  et que E et ES sont à l'équilibre soit :

$$k_1 [E][S] = k_2 [ES] \quad \text{avec} \quad k_m = \frac{k_2}{k_1}$$

#### 10.2.1.2 – Hypothèse de l'état stationnaire de BRIGGS et HALDANE

BRIGGS et HALDANE considèrent que l'hypothèse de MICHAELIS MENTEN est trop restrictive et qu'il est préférable de postuler un état stationnaire, état pour lequel la vitesse de formation du complexe ES est égale à sa vitesse de décomposition dans toutes les directions (formation des produits et relargage du substrat).

Vitesse de formation de ES =  $k_1 [E] [S]$

Vitesse de disparition de ES =  $k_2[ES] + k_3[ES] = (k_2+k_3) [ES]$

L'état stationnaire s'écrit donc :

$$k_1[E][S] = (k_2 + k_3)[ES] \text{ d'où } [E] = \frac{k_2+k_3}{k_1} \frac{[ES]}{[S]}$$

$$\text{Avec } K_m = \frac{k_2 + k_3}{k_1}$$

En écrivant que la quantité d'enzyme mise dans le milieu réactionnel  $[E_T]$ , se répartit en une fraction libre  $[E]$ , et une fraction complexée  $[ES]$ , on a :

$$[E_T] = [E] + [ES]$$

En remplaçant  $[E]$  par sa valeur, on obtient :

$$[E_T] = [ES] \left( 1 + \frac{k_2+k_3}{k_1} * \frac{1}{[S]} \right) \text{ où } [ES] = \frac{[E_T][S]}{\frac{k_2+k_3}{k_1} + [S]}$$

La vitesse de formation du produit étant donnée par :  $V = k_3[ES]$  l'équation générale est de la forme :

$$V = \frac{k_3[E_T][S]}{\frac{k_2 + k_3}{k_1} + [S]}$$

### 10.2.1.3 – Equation de MICHAELIS-MENTEN

Quand la concentration en substrat devient infinie, la vitesse initiale tend vers  $k_3[E_T]$ , c'est la vitesse maximale  $V_m$ ; toute l'enzyme se trouve alors sous forme ES. L'équation devient donc sous sa forme simplifiée :

$$V = \frac{V_m[S]}{K_m + [S]}$$

C'est l'équation de MICHAELIS-MENTEN selon laquelle la vitesse de la réaction enzymatique est une fonction hyperbolique de la concentration en substrat.

Les résultats expérimentaux dans ce cas d'enzymes michaeliennes à un seul substrat corroborent la validité de cette équation.

### 10.2.1.4 – Signification de $K_m$ et $V_m$

- $V_m$  représente la vitesse maximale que peut atteindre la réaction : toute l'enzyme se trouve sous la forme complexée ES.
- Lorsque la vitesse de la réaction atteint la moitié de la vitesse maximale,  $V = \frac{1}{2} V_m$ ,  $K_m$  est alors égale à  $[S]$



- Si  $k_2 \gg k_3$ ,  $K_m = \frac{k_2}{k_1}$ , c'est l'hypothèse de Michaelis-Menten :  $[E] + [S]$  et  $[ES]$  sont à l'équilibre et la formation du produit représente une légère fuite. Dans ce cas,  $K_m$  peut être assimilée à l'inverse de l'affinité de l'enzyme pour le substrat. Plus  $K_m$  est petit et plus l'affinité est grande et vice versa.
- Si  $k_2 \ll k_3$ , l'hypothèse de Michaelis-Menten n'est pas valable et  $K_m$  n'a plus de relation avec l'affinité de l'enzyme pour le substrat. Aussi est-il préférable de considérer  $K_m$  comme une constante empirique égale à la concentration en substrat pour laquelle on a une vitesse initiale égale à  $\frac{V_m}{2}$  dans les conditions expérimentales définies.

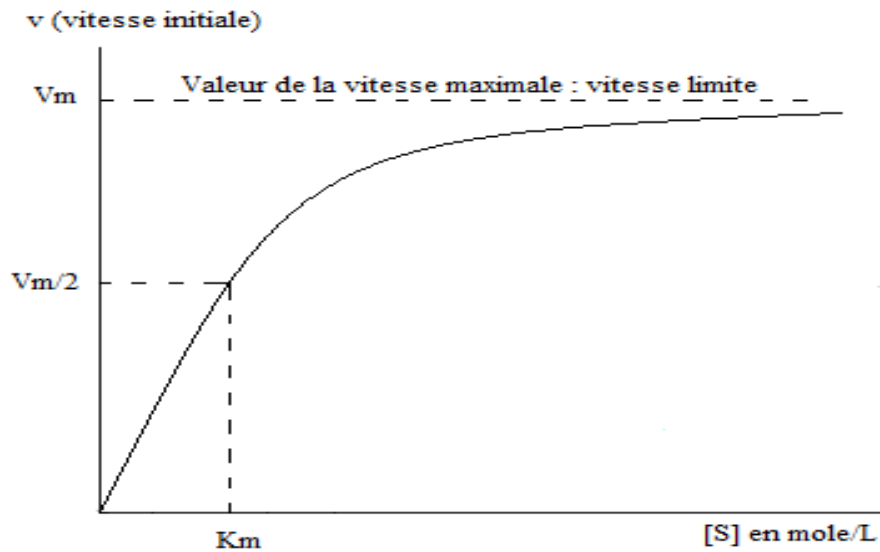
### 10.2.1.5 – Réversibilité et Relation de HALDANE

- À des degrés divers d'ailleurs, les réactions enzymatiques sont réversibles, c'est-à-dire qu'elles peuvent catalyser la réaction inverse :
- $$P + E \xrightleftharpoons[k_3]{k_4} ES \xrightarrow{k_2} E + S$$
- On peut donc écrire :

$$V = \frac{V_m[P]}{K_m + [P]} \text{ avec } K_m = \frac{k_2 + k_3}{k_4} \text{ et } V_m = k_2[E_T]$$

- On en déduit :  $\frac{K_m}{K_m} = \frac{k_1}{k_4}$  et  $\frac{V_m}{V_m} = \frac{k_3}{k_2}$
- D'où la relation d'HALDANE :  $\frac{K_m}{K_m} * \frac{V_m}{V_m} = \frac{k_1 k_3}{k_4 k_2} = K_{eq}$
- $K_{eq}$  = constante d'équilibre de la réaction globale.

Cette relation souligne l'interdépendance de la constante d'équilibre et des paramètres cinétiques d'une réaction enzymatique réversible et montre qu'il n'est pas possible de négliger la réaction inverse dès que les produits s'accumulent.

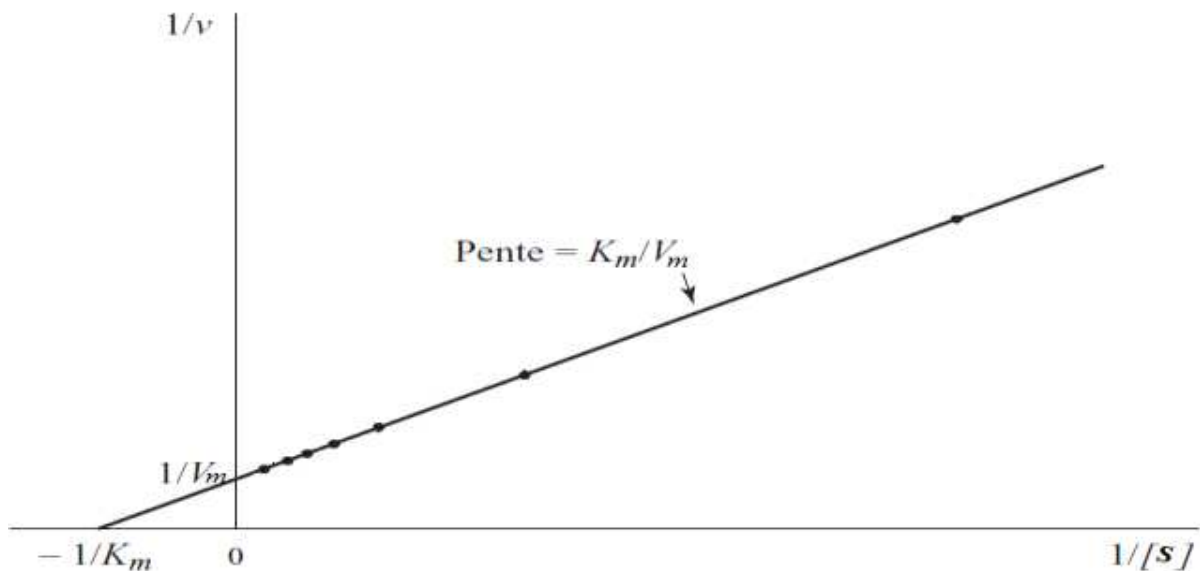


**Figure 10 :** Cinétique à un substrat. Représentation de MICHAELIS-MENTEN.

La difficulté de tracer avec précision l'asymptote à la courbe, et par la suite de déterminer graphiquement  $V_m$  et  $K_m$ , a conduit LINEWEAVER et BURK à proposer un mode de représentation linéaire, qui, actuellement s'est généralisé.

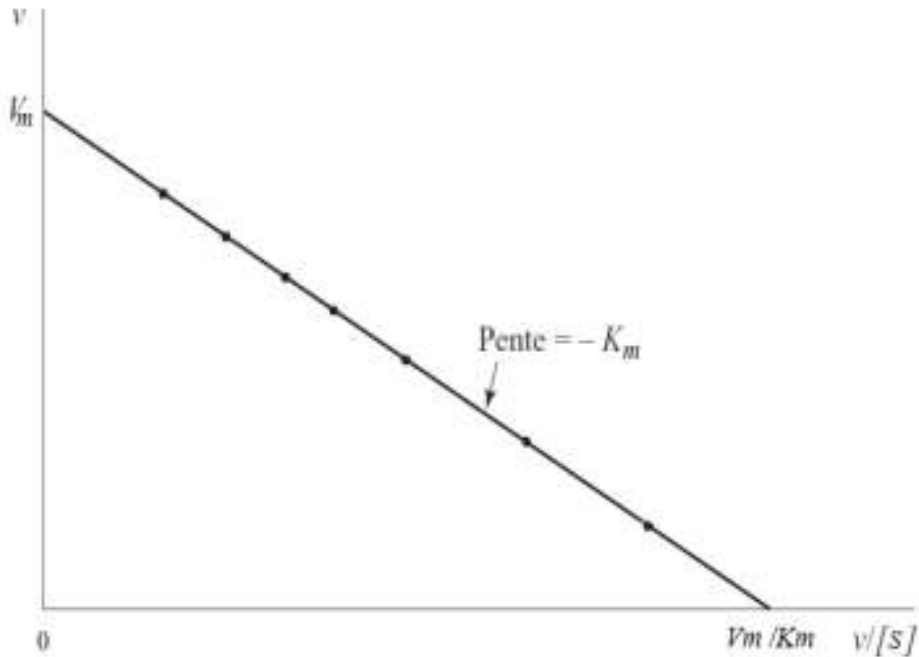
$$\frac{1}{v} = \frac{K_m + [S]}{V_m [S]} \text{ ou encore } \frac{1}{v} = \frac{1}{V_m} + \frac{K_m}{V_m} \frac{1}{[S]}$$

Cette nouvelle équation montre une relation linéaire entre  $\frac{1}{v}$  et  $\frac{1}{[S]}$ , ce qui conduit à la représentation graphique suivante.

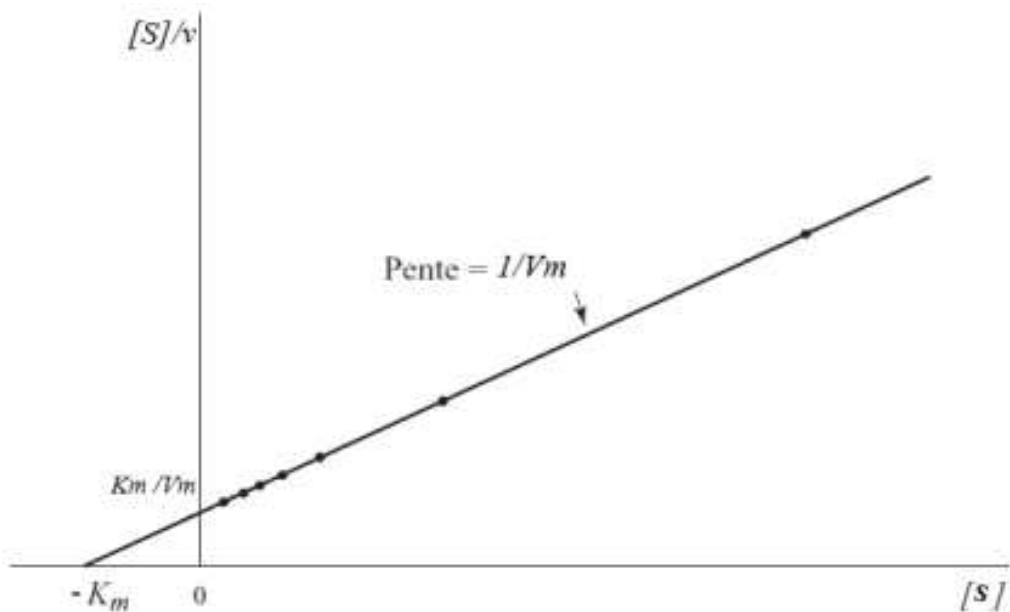


**Figure 11 :** Cinétique enzymatique à un substrat. Représentation de LINEWEAVER et BURK.

Dans la grande majorité des cas, ce type de représentation permet une détermination graphique de  $K_m$  et  $V_m$  plus précise. Cependant, il peut arriver que la droite représentative,  $\frac{1}{v}$  en fonction de  $\frac{1}{[S]}$  ait une très faible pente ou encore une ordonnée à l'origine voisine de zéro; il est alors judicieux de recourir à d'autres types de représentations, qui permettent de mieux apprécier graphiquement  $K_m$  et  $V_m$ .



**Figure 12 :** Représentation d'Eadie :  $v = f\left(\frac{v}{[S]}\right)$



**Figure 13 :** Représentation de Dixon :  $\frac{S}{v} = f(S)$

### 10.2.1.6 – Action des 3 effecteurs : Inhibiteurs, Activateurs, Inactivateurs

La vitesse d'une réaction enzymatique et l'activité enzymatique peuvent être modifiées par la présence de composés autres que le substrat : on les appelle des effecteurs.

Ils jouent un rôle important dans les phénomènes de régulation et sont également fort utiles dans l'étude des mécanismes d'action des enzymes.

On peut classer les effecteurs en deux catégories :

- Les activateurs qui augmentent la vitesse de la réaction enzymatique ;
- Les inhibiteurs et les inactivateurs qui la réduisent.

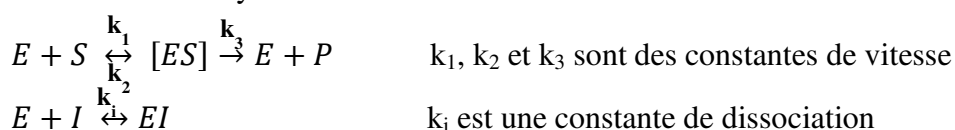
Cette distinction n'est d'ailleurs pas rigoureuse, une même substance, selon les conditions du milieu pouvant être activatrice ou inhibitrice.

Nous nous limiterons ici à la description et l'étude cinétique des divers types d'inhibitions : compétitive, incompétitive et non compétitive.

#### a – Inhibiteur compétitive

L'inhibiteur est une substance de structure chimique et spatiale analogues au substrat et qui vient se loger sur le site actif de l'enzyme, empêchant ainsi la fixation du substrat.

L'association enzyme-inhibiteur est exclusive :



En supposant pour ES l'état stationnaire et pour la deuxième réaction l'état d'équilibre, on peut écrire les équations suivantes :

$$k_i = \frac{[E][I]}{[EI]}$$

$$[ES](k_2 + k_3) = k_1[E][S]$$

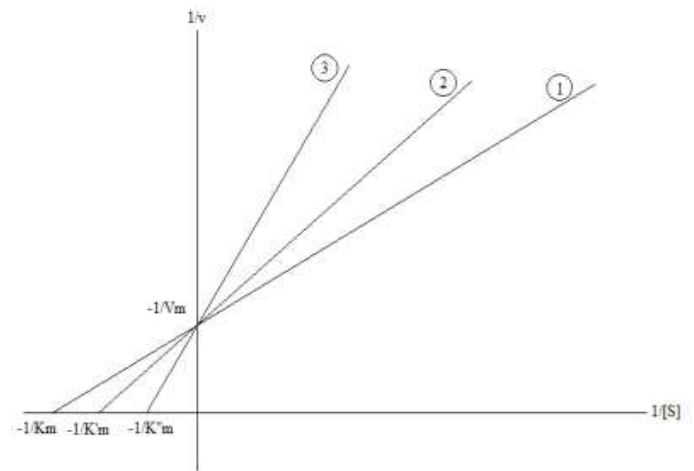
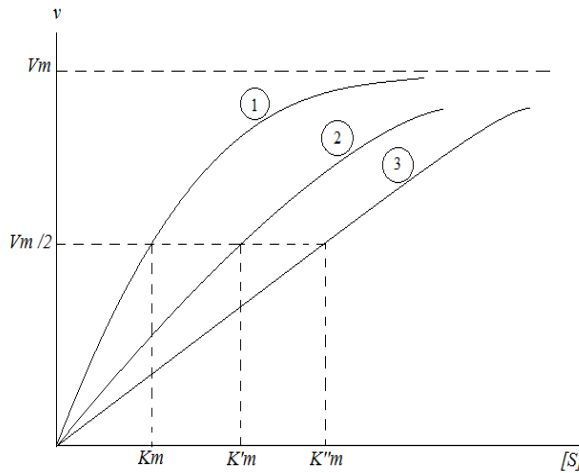
$$[E_T] = [ES] + [E] + [EI]$$

$[E_T]$  étant la quantité totale d'enzyme mise en jeu au départ

$[E]$  la quantité d'enzyme demeurée à l'état libre

- La vitesse est donnée par :  $v = k_3[ES]$  ou encore :
- $v = \frac{V_m[S]}{K_m\left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right) + [S]}$  ou  $\frac{1}{v} = \frac{1}{V_m} + \frac{K_m}{V_m} \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right) \frac{1}{[S]}$  Avec  $K'_m = K_m \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right)$
- Ces équations montrent que la vitesse maximale n'est pas modifiée par la présence d'inhibiteur, ce qui signifie que la compétition substrat-inhibiteur pour le site de fixation de l'enzyme est en faveur du substrat dès que l'on augmente la concentration de ce dernier. Par contre la constante apparente  $K'_m$  en présence d'inhibiteur est plus

grande que la constante  $K_m$ , en absence d'inhibiteur. Ces faits sont traduits graphiquement dans les courbes données ci-dessous.



#### Inhibition compétitive selon MICHAELIS-MENTEN

- (1) sans inhibiteur :  $[I] = 0$ ;
- (2) avec inhibition à la concentration  $[I_1]$ ;
- (3) avec inhibiteur à la concentration  $[I_2]$  ( $[I_2] > [I_1]$ )

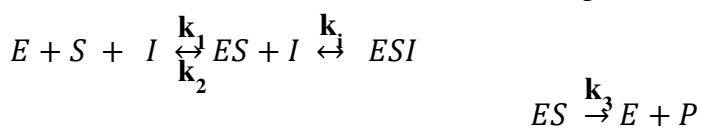
#### Inhibition compétitive selon LINEWEAVER et BURK

- (1) sans inhibiteur :  $[I] = 0$ ;
- (2) avec inhibition à la concentration  $[I_1]$ ;
- (3) avec inhibiteur à la concentration  $[I_2]$  ( $[I_2] > [I_1]$ )

### b – Inhibiteur incompétitive

C'est une inhibition par blocage du complexe ES. On suppose l'existence sur l'enzyme de deux sites de fixation, l'un réservé au substrat, l'autre à l'inhibiteur, mais ce dernier ne peut se fixer de façon réversible que sur le complexe intermédiaire ES.

L'association enzyme-inhibiteur est non exclusive. L'inhibiteur ne permet pas au complexe ternaire ESI, d'évoluer vers l'élaboration du produit. On aboutit à un cul-de-sac.



En supposant que la réaction formant ESI est à l'équilibre, et ES à l'état stationnaire, on peut écrire les équations suivantes et en déduire l'équation des vitesses :

$$[ESI] = \frac{[ES][I]}{K_i}$$

$$k_1[E][S] = (k_2 + k_3)[ES]$$

$$[E_T] = [ES] + [ESI] + [E]$$

D'où

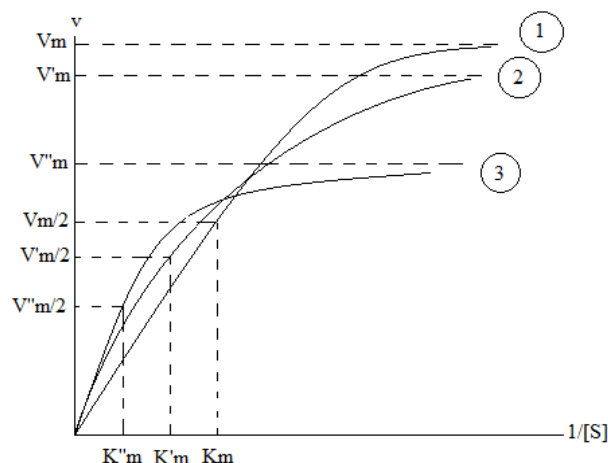
$$v = \frac{V_m}{1 + \frac{[I]}{K_i}} \cdot \frac{[S]}{K_m + [S]} \quad \text{ou encore} \quad \frac{1}{v} = \frac{K_m}{V_m} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_m} \left( 1 + \frac{[I]}{K_i} \right)$$

Avec  $V'_m = \frac{V_m}{\left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right)}$  et  $K'_m = \frac{K_m}{\left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right)}$

Dans ce type d'inhibition, la vitesse maximale  $V'_m$ , et la constante apparente  $K'_m$  sont plus petites que  $V_m$  et  $K_m$  en absence d'inhibiteur.

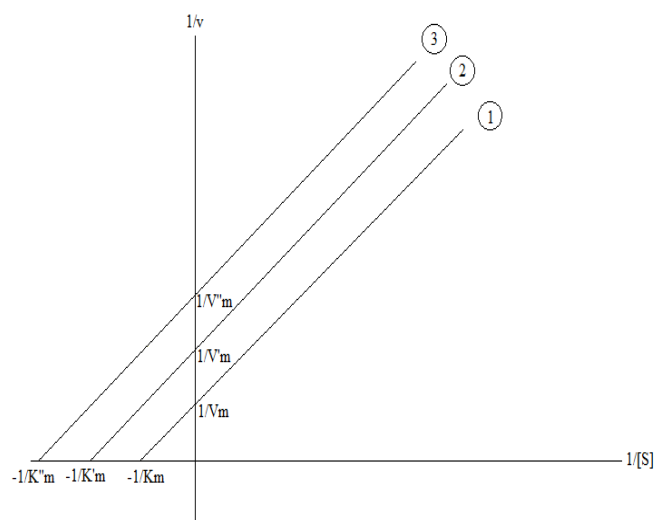
L'inhibiteur favorise la formation du complexe ES.

Les courbes représentées à la figure suivante traduisent ces phénomènes.



**Inhibition non compétitive selon MICHAELIS-MENTEN**

- (1) sans inhibiteur :  $[I] = 0$ ;
- (2) avec inhibition à la concentration  $[I_1]$ ;
- (3) avec inhibiteur à la concentration  $[I_2]$  ( $[I_2] > [I_1]$ )

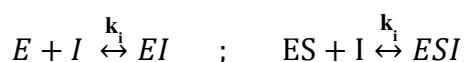
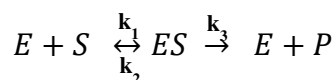


**Inhibition non compétitive selon LINEWEAVER et BURK**

- (1) sans inhibiteur :  $[I] = 0$ ;
- (2) avec inhibition à la concentration  $[I_1]$ ;
- (3) avec inhibiteur à la concentration  $[I_2]$  ( $[I_2] > [I_1]$ )

### c – Inhibition non compétitive

L'inhibiteur se lie indifféremment à l'enzyme libre ou au complexe enzyme-substrat sur un site qui lui est propre. Ici encore l'association est de type non exclusif. Comme dans l'inhibition non compétitive le complexe ESI ne peut donner naissance au produit de la réaction.



En supposant les concentrations de EI et de ESI à l'équilibre, les constantes d'équilibre de la fixation de I sur E et de I sur ES identiques et égales à  $k_i$  (ce qui signifie que le substrat est sans effet sur la fixation de l'inhibiteur), et enfin l'état stationnaire pour ES, on peut écrire les équations suivantes et en déduire l'équation des vitesses :

$$[EI] = k_i[E][I]$$

$$[ESI] = k_i[ES][I]$$

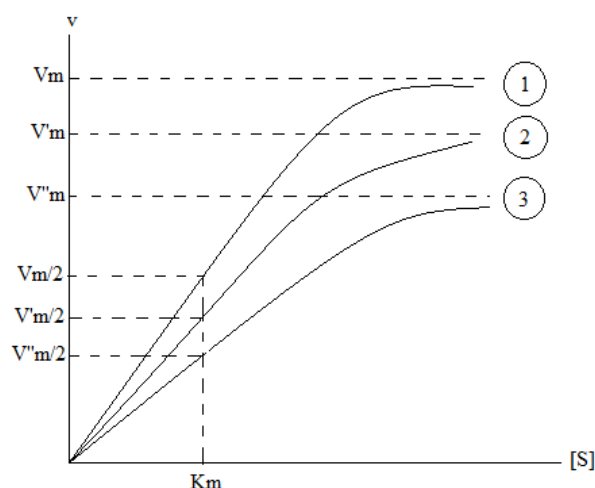
$$(k_2 + k_3)[ES] = k_1[E][S]$$

$$[E_T] = [E] + [ES] + [EI] + [ESI]$$

D'où

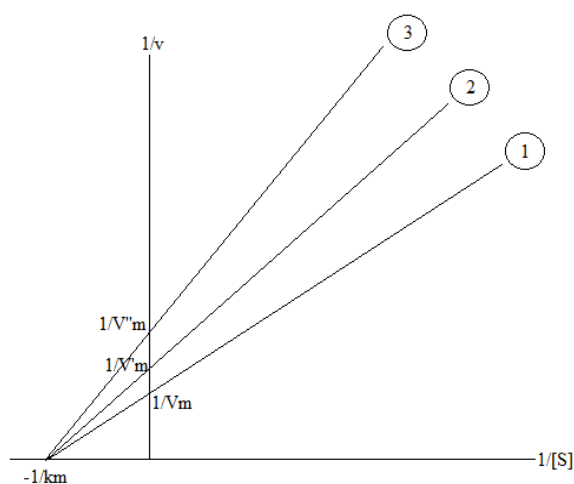
$$v = \frac{V_m \cdot [S]}{k_m + [S]} * \frac{1}{1 + \frac{[I]}{K_i}}$$

Dans ce type d'inhibition non compétitive, la vitesse maximale diminue tandis que  $K_m$  reste inchangé, ce qui traduit dans la représentation de LINEWEAVER et BURK par un faisceau de droites coupant l'axe des abscisses à  $-1/k_m$ .



**Inhibition non compétitive selon MICHAELIS-MENTEN**

- (1) sans inhibiteur :  $[I] = 0$ ;
- (2) avec inhibiteur à la concentration  $[I_1]$ ;
- (3) avec inhibiteur à la concentration  $[I_2]$  ( $[I_2] > [I_1]$ )



**Inhibition non compétitive selon LINEWEAVER et BURK**

- (1) sans inhibiteur :  $[I] = 0$ ;
- (2) avec inhibiteur à la concentration  $[I_1]$ ;
- (3) avec inhibiteur à la concentration  $[I_2]$  ( $[I_2] > [I_1]$ )

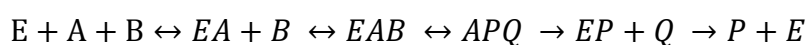
## 10.2.2 – Cinétiques à plusieurs substrats

à part les isomérases, les lyases et les hydrolases (concentration en eau constante et en excès : c'est le solvant), toutes les autres enzymes, oxydoréductases, transférases et ligases obéissent à des cinétiques à plusieurs substrats, le second substrat pouvant être une coenzyme.

Sans vouloir entrer dans les détails des équations de vitesse, nous nous bornerons à donner les grandes lignes des principaux schémas réactionnels avec les graphiques correspondants dans la représentation de LINEWEAVER et BURK.

### 10.2.2.1 – Mécanisme ordonné ou séquencé

Dans ce type de mécanisme, l'enzyme se lie dans un ordre déterminé à chacun des deux substrats pour donner un complexe ternaire, qui évolue vers les produits de la réaction selon le schéma:



On établit que la vitesse de la réaction globale est donnée par l'expression :





Dans les deux cas l'expression de la vitesse de la réaction est analogue, seule les constantes varient, ce qui se traduit par des graphes différents.

**a) Fixation dépendante:**

L'équation des vitesses est donnée par :

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{V_0} \left( 1 + \frac{K'_A}{A} + \frac{K'_B}{B} + \frac{K_A K'_B}{[A][B]} \right)$$

Avec :

$$K_A K'_B = K_A K_B$$

$K_A, K'_A, K_B, K'_B$  étant des constantes fonctions des constantes de vitesse.

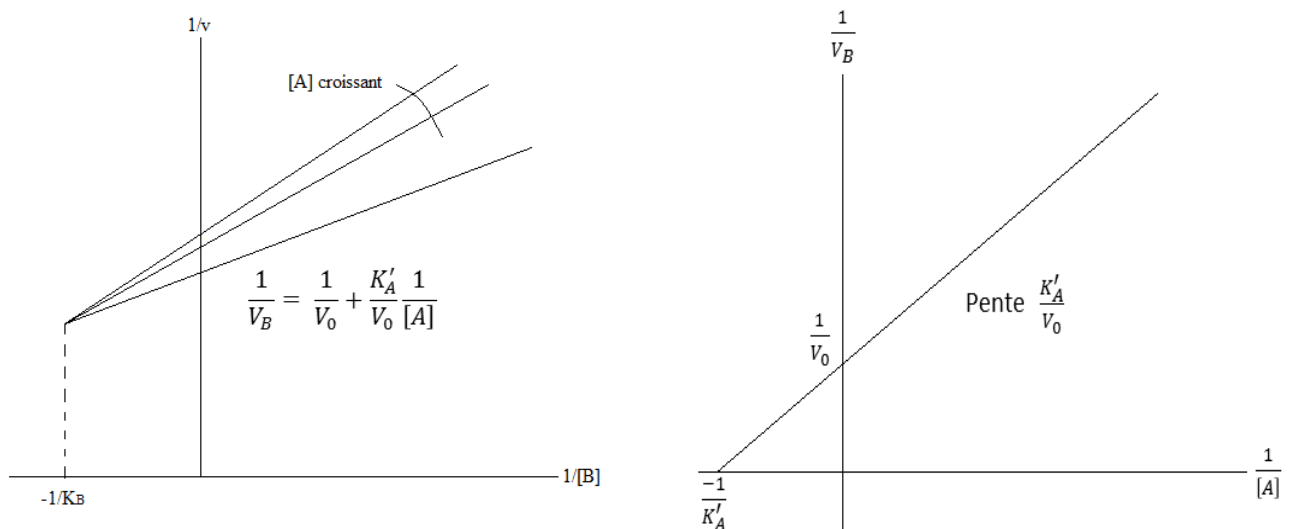
La représentation de  $1/v$  en fonction de  $1/[B]$ , pour  $[A]$  constant, donne une droite. Selon les valeurs de  $[A]$ , on obtient un faisceau de droites permettant de déterminer deux des constantes,  $K'_A$  et  $K_B$ . Un graphe analogue, en prenant  $[B]$  constant, permettrait de déterminer  $K'_B$  et  $K_A$ . En fait on préfère représenter  $1/V_B$  en fonction de  $1/[A]$ , ( $1/V_B$  étant l'interaction avec l'axe  $1/v$  des droites  $1/v=f(1/[B])$ )

**b) Fixation indépendante**

L'équation des vitesses ne fait plus apparaître que deux constantes  $K_A$  et  $K_B$  :

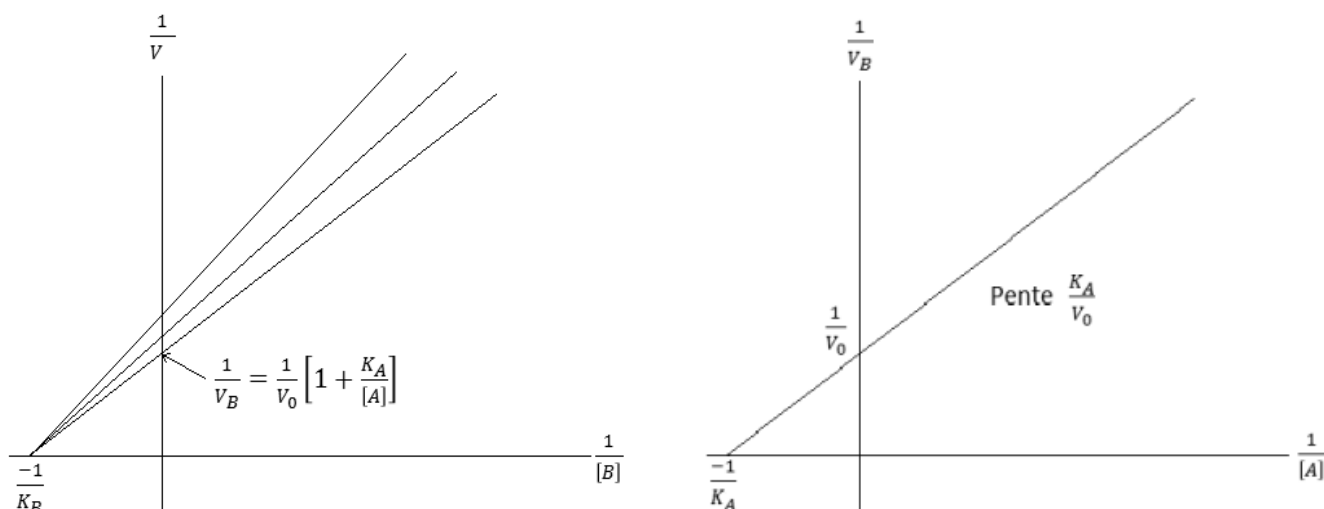
$$\frac{1}{v} = \frac{1}{V_0} \left[ 1 + \frac{K_A}{[A]} + \frac{K_B}{[B]} + \frac{K_A K_B}{[A][B]} \right]$$

Les graphes, représentant  $1/v$  en fonction de  $1/[B]$  avec  $[A]$  constant, sont des droites se coupant sur l'axe des abscisses au point  $-1/K_B$ .



**Figure 15 : Cinétique à deux substrats. Mécanisme d'association au hasard.**

**Fixation dépendante**

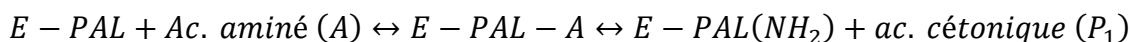


**Figure 16 :** Cinétique à deux substrats. Mécanisme d'association au hasard.

#### Fixation indépendante

##### 10.2.2.3 – Mécanisme Ping-Pong

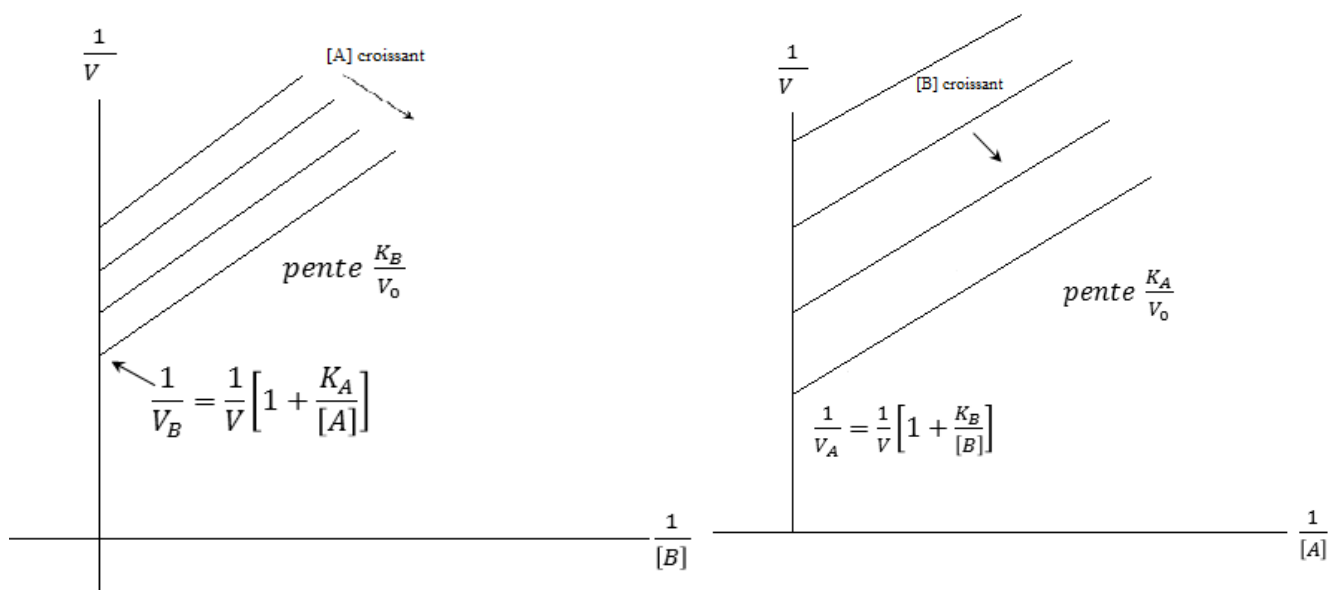
Ce mécanisme est fréquent dans le cas d'enzymes fonctionnant avec, comme cofacteur, un groupement prosthétique. Le premier substrat se fixe sur l'enzyme, est transformé par le groupement prosthétique qui subit une modification chimique. Le deuxième substrat permet à l'enzyme de retrouver son état initial. Les transaminases à phosphate de pyridoxal obéissent à ce mécanisme, le groupement  $\text{NH}_2$  jouant le rôle de balle de ping-pong.



La vitesse de la réaction globale est donnée par :

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{v_0} \left[ 1 + \frac{K_A}{[A]} + \frac{K_B}{[B]} \right]$$

Ce qui se traduit par des droites parallèles sur les graphiques correspondants.



**Figure 17 :** Cinétique à plusieurs substrats. Mécanisme Ping - Pong

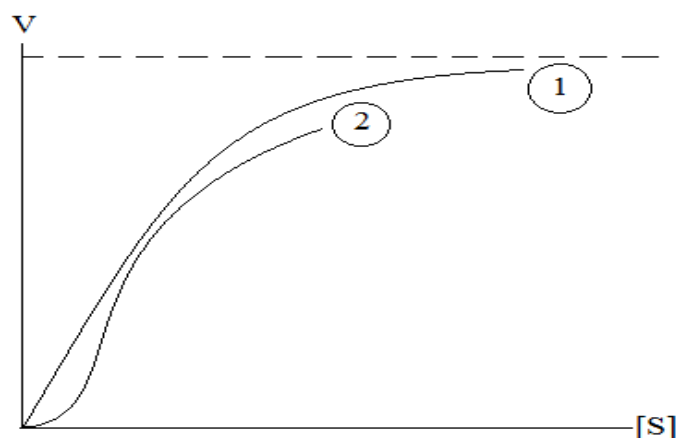
### 10.3 – Enzymes allostériques

Toutes les enzymes ne sont pas de type Michaélien. En effet, certaines d'entre elles, qui jouent un rôle important dans la régulation des processus métaboliques de la cellule vivante, n'obéissent pas à la cinétique michaélienne.

Ces enzymes de régulation sont généralement oligomériques, c'est-à-dire constituées d'un petit nombre de monomère plusieurs sites spécifiques, dits sites allostériques, pour la fixation de différents ligands, dont le substrat. En se fixant sur l'enzyme, ces ligands entraînent une modification de la configuration du site de fixation du substrat. Ils facilitent ou défavorisent la liaison du substrat à l'enzyme, agissant comme régulateur du fonctionnement de l'enzyme. On dit qu'il existe un effet de coopérativité entre les sites.

Si cette modification de configuration favorise la fixation du substrat, on a affaire à un activateur allostérique qui tend à redonner à l'enzyme une cinétique michaélienne, ce qui correspond à un déplacement de l'équilibre vers la forme ayant le plus d'affinité pour le substrat. Dans le cas contraire, nous sommes en présence d'un inhibiteur allostérique qui accentue le caractère sigmoïde de la courbe  $v=f(S)$ .

La molécule régulatrice peut être très dissemblable du substrat du point de vue structure, l'interaction est dite de type hétérotrope. La régulation peut être réalisée par le substrat lui-même, de manière analogue à ce qui est observé pour l'hémoglobine ou la fixation d'une première molécule d'oxygène sur une des quatre unités du tétramère provoque une modification de conformation de l'oligomère et facilite la fixation des trois autres molécules d'oxygène; l'interaction est dite homotrope. C'est d'ailleurs pour expliquer la cinétique de fixation de l'oxygène par l'hémoglobine et également le comportement non michaélien de certaines enzymes que deux molécules théoriques ont vu le jour: l'un est dû à MONOD, WYMAN et CHANGEUX (Modèle MWC), l'autre à KOSHLAND, NEMETHY et FILMER (modèle KNF).



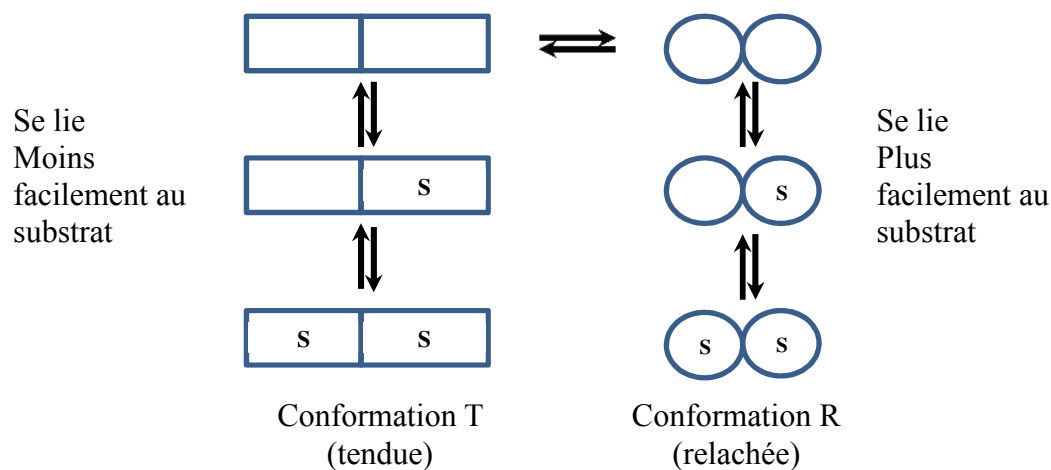
**Figure 18 : Cinétique des enzymes.**

- 1) **Comportement Michaélien;**
- 2) **Comportement allostérique** (courbe sigmoïde typique)

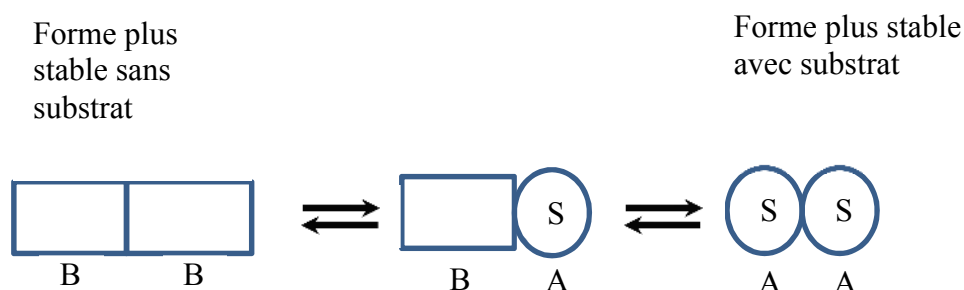
Ces deux modèles mettent l'accent sur les interactions entre les unités voisines à l'intérieur de l'oligomère. Ils considèrent que pour chaque unités existent deux conformations distinctes dont les capacités de fixation du substrat sont différentes.

Dans le modèle MWC, appelé encore modèle de symétrie, l'équilibre entre les deux conformations distinctes dont les capacités de fixation du substrat sont différentes.

Dans le modèle MWC, appelé encore modèle de symétrie, l'équilibre entre les deux conformations (forme T ou tendue, représentée par MM, et forme R ou relachée représentée par VV), est, en l'absence de substrat fortement déplacé vers la conformation la moins favorable à la fixation du substrat, forme T par exemple, et les conformations hybrides, du type TR sont négligeables, ce qui signifie que les interactions entre un cercle et un carré sont très défavorisées par rapport aux interactions entre deux cercles ou deux carrés.



**Figure 19 :** Modèle de MONOD, WYMAN et CHANGEUX pour une enzyme dimère.



**Figure 20 :** Modèle de KOSHLAND, NEMETHY et FILMER pour une enzyme dimère.

En présence de substrat, l'équilibre va se déplacer en faveur de la forme R. La fixation de la première molécule de substrat sur le dimère sera lente du fait de la nécessité d'induire la transconformation  $T \rightarrow R$ ; par contre la fixation de la deuxième molécule de substrat sera beaucoup plus rapide. On est en présence d'un effet coopératif homotrope positif, qui donne une courbe  $v=f(S)$  sigmoïde.

Le modèle de KOSHLAND, NEMETHY et FILMER prend en compte la formation d'espèces hybrides, du type MV ou VM la notion de symétrie n'existe plus. Ici l'accent est mis sur le pouvoir de modification de la conformation que possède le substrat vis-à-vis de l'enzyme (théorie de l'ajustement induit); ceci implique que la forme M soit la seule conformation capable de fixer le substrat.

## **10.4 – Effet des divers paramètres**

### **10.4.1 – pH**

Toutes les enzymes sont sensibles aux variations de la concentration en  $H^+$  du milieu. Il existe une zone de pH pour laquelle l'activité enzymatique est maximale. Cette zone de pH est la résultante de plusieurs paramètres : température, force ionique, concentration en substrat qui sont des paramètres extérieurs, mais aussi nature de l'enzyme.

En effet, parmi les résidus d'AA de la molécule enzymatique qui possèdent des groupements ionisables, certains vont lier et positionner le substrat, d'autres participer à la réaction, et la plupart servir au maintien de la conformation de l'enzyme. Ces résidus, comme le substrat dans bien des cas, sont sensibles au pH et possèdent des états d'ionisation différents selon la valeur du pH. On comprend aisément que, quand un groupement  $-COO^-$  du site actif est nécessaire à la fixation du substrat, l'abaissement du pH du milieu entraîne sa transformation en  $-COOH$  qui ne permet plus la fixation du substrat et supprime l'activité de l'enzyme.

### **10.4.2 – Température**

Comme pour le pH, il existe une zone de température, parfois étroite, pour laquelle l'activité enzymatique est maximale. Cette variation de l'activité enzymatique en fonction de la température est déterminée par la mesure, dans des conditions opératoires bien définies (concentration de substrat et d'enzyme, pH, force ionique), des variations de la vitesse initiale en fonction de la température du milieu.

En fait, la variation de l'activité enzymatique résulte de deux effets antagonistes : d'une part l'augmentation de l'agitation des molécules avec l'élévation de température qui va accroître la fréquence des collisions entre le substrat et l'enzyme, d'autre part la dénaturation de la protéine enzymatique. Cette dénaturation va modifier les structures tertiaire et quaternaire de la protéine globulaire et donc faire passer l'enzyme d'une conformation active à une conformation dépourvue d'activité. En fait, dans la dénaturation des enzymes par la chaleur, ce qui compte surtout, c'est le couple temps-température, c'est-à-dire la durée et l'intensité du traitement thermique.

### **10.4.3 – Influence de la teneur en eau**

Les enzymes sont des protéines globulaires solubles dans l'eau et les réactions enzymatiques se déroulent, pour la plupart, en milieu aqueux.

Il est toutefois courant d'observer que des aliments protégés du développement microbien par suite de traitements de déshydratation partielle (séchage des végétaux non blanchis) subissent néanmoins, malgré les faibles teneurs en eau, des dégradations enzymatiques conduisant l'apparition d'odeur ou de goût désagréables.

Dans de tels cas, le rôle de solvant de l'enzyme joué habituellement par l'eau, est tout à fait secondaire et non indispensable.

La lipase, située aux interfaces huile-eau, et la lipoxigénase qui fonctionnent à de très faibles activités de l'eau, illustrent bien ce type de comportement.

Par ailleurs, l'eau intervient dans toutes les réactions d'hydrolyse en tant que second substrat. Dans ce cas, le facteur à prendre en compte n'est plus la teneur en eau elle-même, mais l'activité de l'eau dans le milieu considéré, activité qui chiffre son degré de disponibilité, notamment pour participer à la réaction d'hydrolyse enzymatique.

Lorsque les teneurs en eau sont très faibles, tout facteur augmentant la mobilité de l'enzyme et la fréquence des collisions enzyme-substrat accélèrera le développement des réactions enzymatiques; un des exemples les mieux connus est celui du pétrissage intensifié qui favorise l'action des lipoxigénases. Compte tenu de l'existence de facteur limitant lié à la mobilité des réactants, les cinétiques ne sont plus michaéliennes.

### **10.4.4 – Rayonnements**

Les rayonnements, de type électromagnétique ou corpusculaire, peuvent avoir, sur les enzymes une action dénaturante. Celle-ci s'exerce soit de façon directe en provoquant des ruptures de liaisons : désamination et décarboxylation des résidus d'acides aminés ou rupture de liaisons peptidiques, soit de façon indirecte en modifiant les caractéristiques physiques du milieu, élévation de température sous l'action des infra rouges (I.R.) ou des micro-ondes, variations de pH ou de rH sous l'action des rayonnements ionisants.

Avec ces derniers, il faut, pour obtenir une inactivation totale des enzymes, appliquer des doses élevées, de l'ordre de 80 à 100 kgrey (8 à 10 Mrad) bien supérieures aux doses permettant d'obtenir une stérilisation ou radappertisation : 4 à 6 Mrad. Cette propriété permet d'utiliser les radiations ionisantes (rayons gamma ou rayons cathodiques) pour stériliser des préparations enzymatiques ou encore pour accélérer certaines réactions de polymérisation dans la préparation des enzymes immobilisées.

# La fermentation

## Bioproduction et Bioproduiteur industrielle

---

# Plan de travail

- I. Introduction
- II. Les types de la fermentation
- III. application de fermentation a l'échelle industrielle

## Bioproduction et Bioproducteur

(Aspects technologiques)

- IV. Conclusion



# INTRODUCTION

Bière, vin, vinaigre, yaourt, pénicilline, acide lactique, biogaz, éthanol, glycérine, ... **quelle relation peut-il bien exister entre tous ces produits ?**

De même, quel point commun pourrait-on trouver entre l'activité principale du boulanger - fabriquer du pain - et le fonctionnement d'une station d'épuration ?

En fait toutes ces productions, et bien d'autres, utilisent un **outil vivant**. Le processus de transformation mis en œuvre exploite des microorganismes – **la biomasse - dont le développement modifie les caractéristiques de la matière – le substrat - sur ou dans laquelle ils se sont développés.**

# Historique

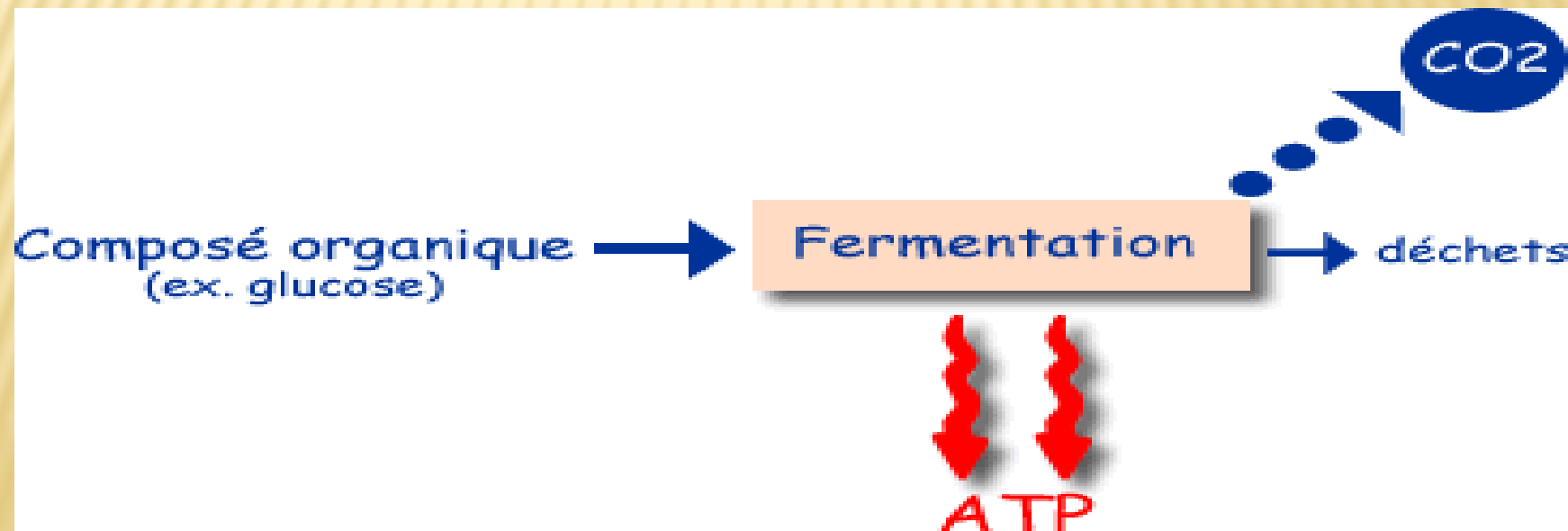
- Pasteur prouve en 1854 que les germes n'apparaissent pas spontanément dans les milieux « propices à la fermentation », mais qu'ils proviennent du milieu environnant et se multiplient lorsqu'ils sont dans des conditions favorables.
- La chimie de fermentation d'abord été étudiée par Louis Pasteur en 1860.
- Il a appelé le processus de la VIE sans air.
- En 1897 Hans et Eduard Beichner découvrent que la fermentation peut se produire dans un extrait acellulaire de la levure,
- ce travail a conduit à l'élucidation de l'enzyme impliqué,



# Définition

Les fermentations résultent de l'action d'enzymes microbiennes sur un substrat organique. Ces réactions biologiques qui dégradent le substrat sont des réactions d'oxydo-réductions se produisant à l'abri de l'air (anaérobiose)

La fermentation permet la production d'une petite quantité d'ATP en absence d'oxygène.





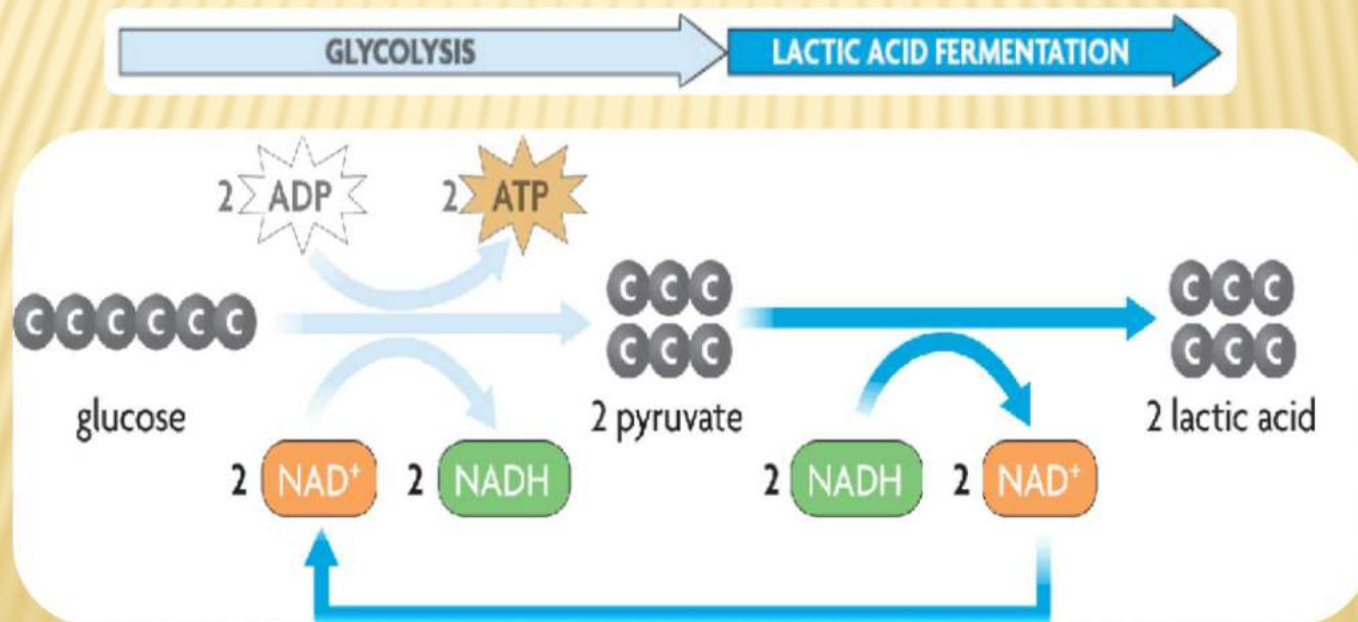
## Les types de la fermentation

Il existe deux procédés de fermentation primaire:

1. la fermentation lactique
2. la fermentation alcoolique

### 1. Fermentation lactique

L'acide pyruvique formé au cours de la glycolyse est décomposé en acide lactique et de l'énergie est libérée (ce qui est utilisé pour former l'ATP).  
Glucose → Ac. Pyruvique → L'acide lactique + énergie



# Fermentation lactique

Elle intervient dans l'élaboration des yaourts, des laits fermentés, des saucissons, de la choucroute, du levain pour le pain, de certains fromages.

- Elle est **homolactique** quand sous l'action de bactéries homofermentaires on obtient **l'acide lactique est majoritaire**.

Parmi **les bactéries homofermentaires** des bactéries des genres *Lactococcus*, *Lactobacillus* et *Streptococcus*.

- Elle est **hétérolactique** quand sous l'action de bactéries hétéro fermentaires on obtient de **l'acide lactique et d'autres produits, éthanol, acide éthanoïque, dioxyde de carbone**.

Parmi **les bactéries hétéro fermentaires** des bactéries des genres *Leuconostoc* et certains *Lactobacillus*.

# La fermentation Malolactique

---

Est un cas particulier, l'acide lactique se formant au détriment de l'acide malique qui donne à un vin par exemple une acidité ("sa verdeur") la plupart du temps non souhaitée (vins rouges de qualité).

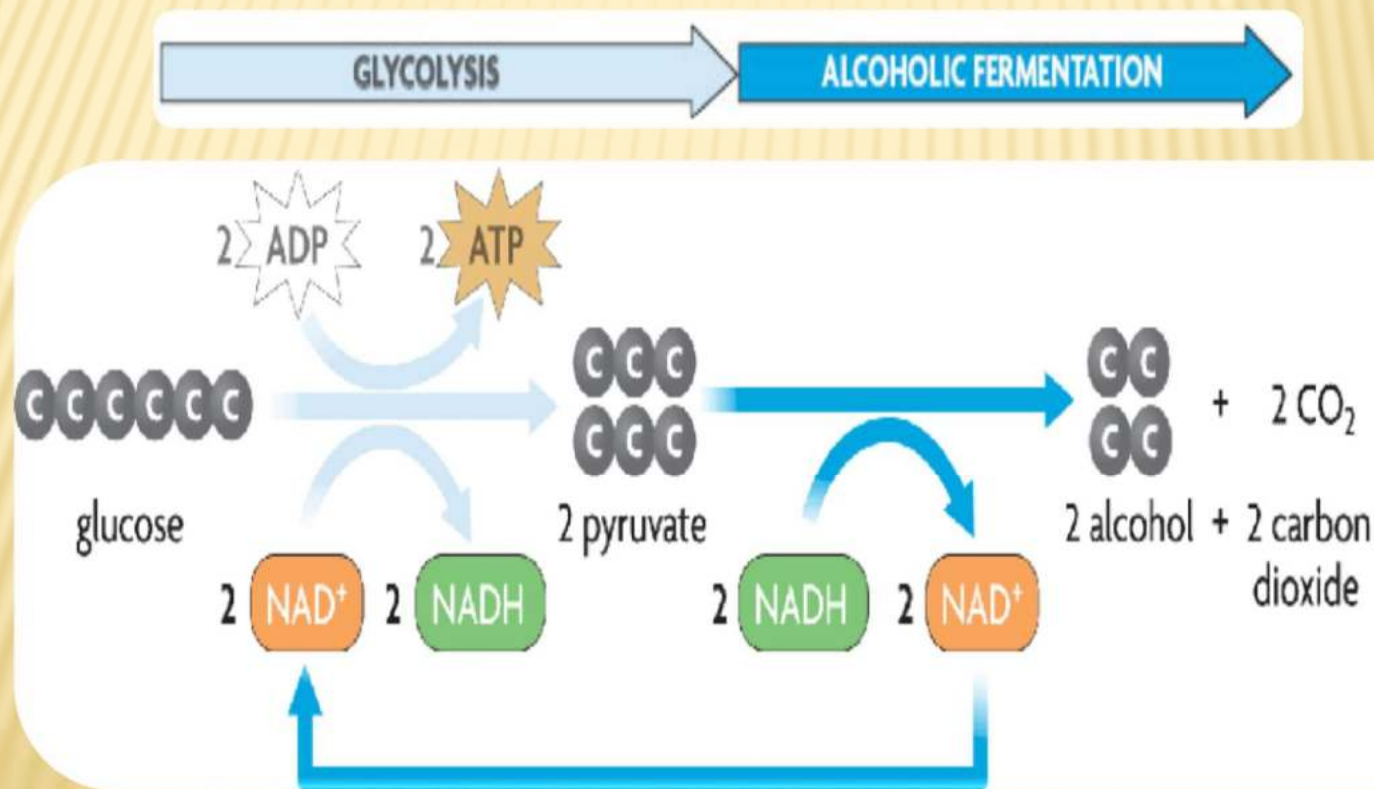


# La fermentation alcoolique

se produit par des levures et des bactéries.

L'acide pyruvique formé au cours de la glycolyse se décompose pour produire de l'alcool et du dioxyde de carbone et est libéré (qui est utilisé pour former de l'ATP).

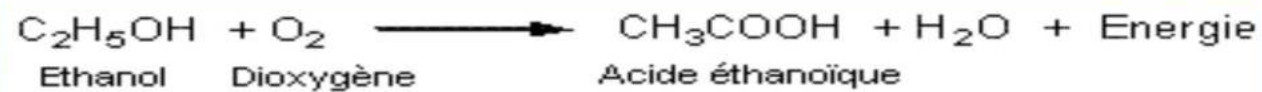
Glucose  $\rightarrow$  acide pyruvique  $\rightarrow$  alcool + dioxyde de carbone + énergie



Il existe d'autre type de fermentation comme

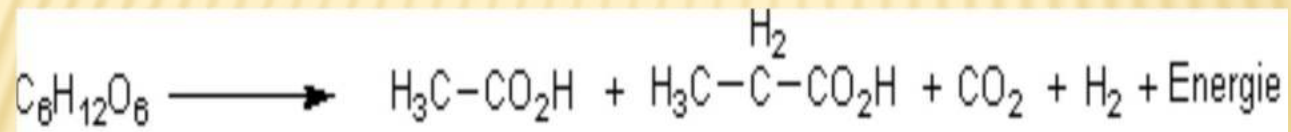
### Fermentation acétique

: Il se forme de l'acide éthanoïque à partir de l'éthanol.



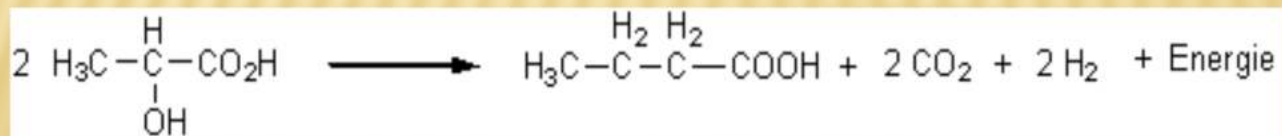
### Fermentation propénoïque :

De l'acide propénoïque, de l'acide éthanoïque ainsi que du  $\text{CO}_2$  et du dihydrogène se forment.



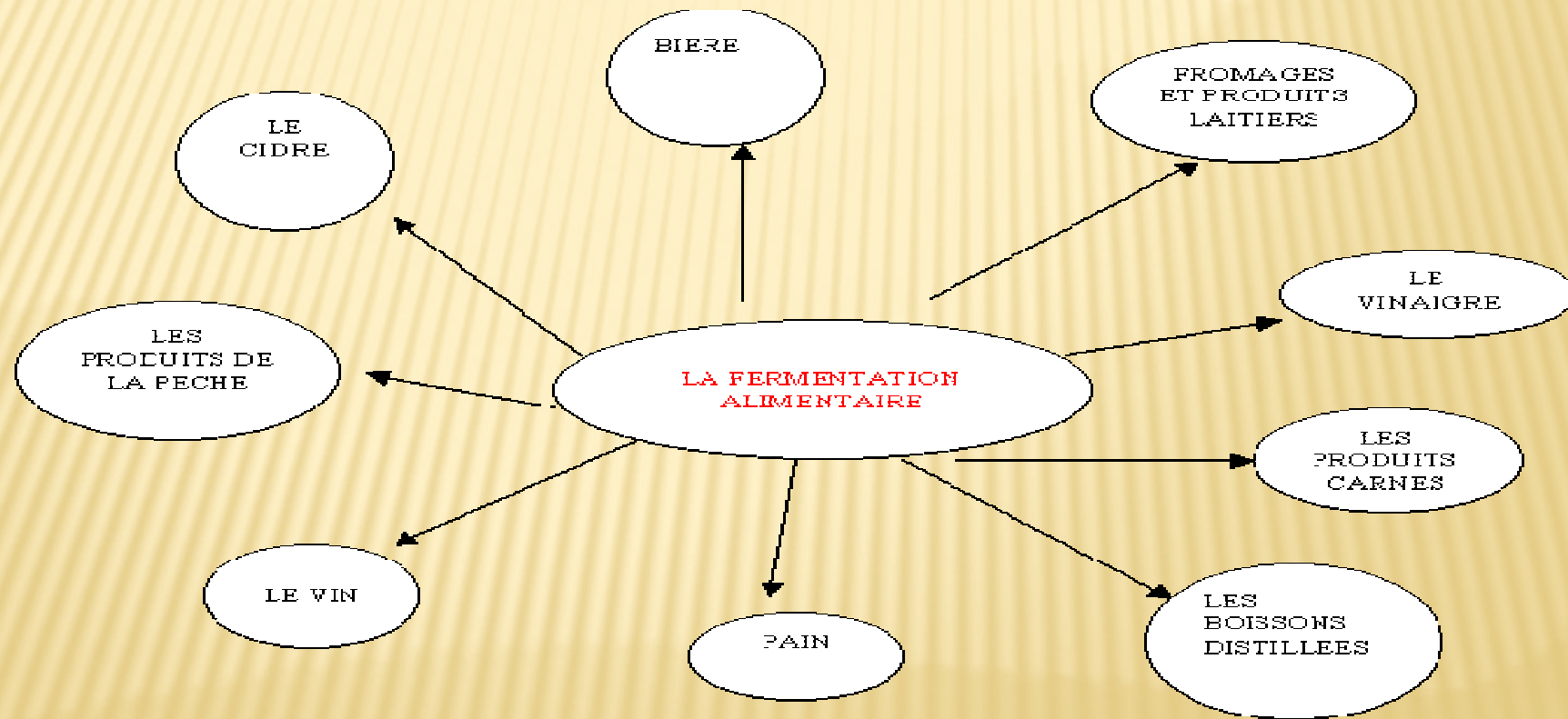
### Fermentation butyrique

Il se forme de l'acide butanoïque, du  $\text{CO}_2$  et du dihydrogène à partir de l'acide lactique déjà formé par fermentation lactique :





La fermentation est utilisée dans plusieurs domaines de la production alimentaire.



# les micro-organismes impliqués dans la fermentation

Substrat	Biomasse	Produit	Réaction biochimique
Malt cuit dans l'eau	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (levure de brasserie)	Bière Fermentation	alcoolique
Lait	<i>Streptococcus thermophilus</i> & <i>Lactobacillus</i> (bactéries)	yaourt	Fermentation lactique
Pâte à pain	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (levure de brasserie)	Pain Fermentation	alcoolique + cuisson

Tableau : Quelques exemples d'application du génie microbiologique

---

# Bio-producteur & Bio-production



## Bio-production et Bio-producteur

Bioproducteur ou fermenteur est une appareil dans lequel on multiplie les champignons, levure, bactéries ...etc.

Les bioproducteur permettent la fabrication de nombreux produits :  
bière, yaourts, additifs alimentaires



## *Les techniques de culture:*

L'intérêt des biotechnologies dans les industries agro-alimentaires est d'obtenir des métabolites utiles, des molécules qui ont un intérêt industriel à partir de matériel biologique. l'obtention de ces molécules se réalisent en 2 étapes:

### *1. La production du produit intéressant appelé fermenteur:*

La production se fait à partir de procédés de fermentation. Ils sont constamment développés afin de cultiver les micro organismes dans les conditions optimales pour qu'ils puissent produire les produits désirés.

### *2. La récupération du produit formé:*

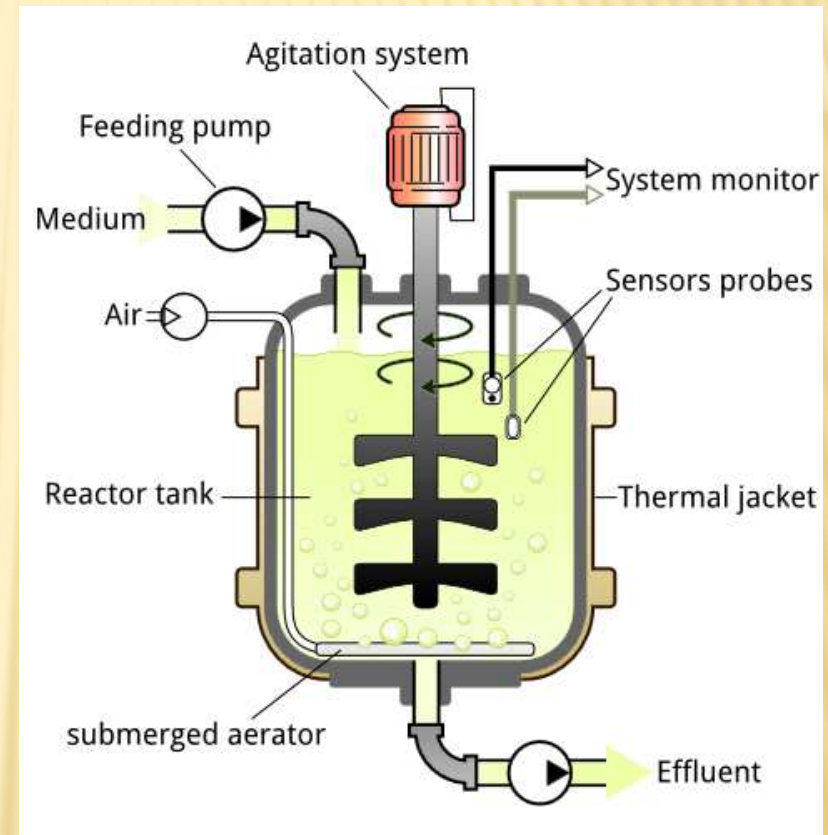
L'extraction et la purification du produit doivent être réalisées par des techniques douces comme l'électrophorèse , la distillation ou la chromatographie.



# Composition d'un bioproducteur

Un bioproducteur comporte :

- Une cuve en verre ou en acier inoxydable
- Un bouchon si nécessaire pour ne pas laisser passer l'air du milieu intérieur et celui du milieu extérieur
- Une seringue avec tube de souplesse variable pour injecter une solution
- Un système d'agitation comportant une ou plusieurs turbines selon leur taille
- Des capteurs pour la mesure de la température (thermomètre), du pH (pH-mètre)



Principe du bioréacteur

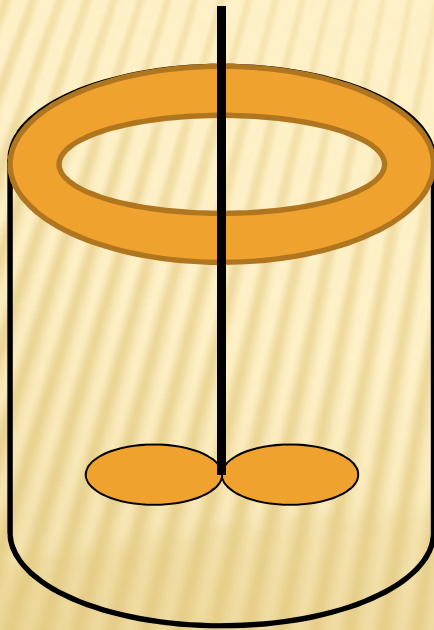
# Mode de conduite des bioréacteurs (Les différents systèmes de fermentation)

Il existe différents modes de conduite pour alimenter et soutirer du milieu de culture aux bioréacteurs

## 1. Mode d'alimentation par batch

La cuve est remplie par le milieu de culture stérilisé, puis l'inoculum. La fermentation se déroule ensuite sans addition supplémentaire de milieu

- **Système fermé: cuvée (batch)**

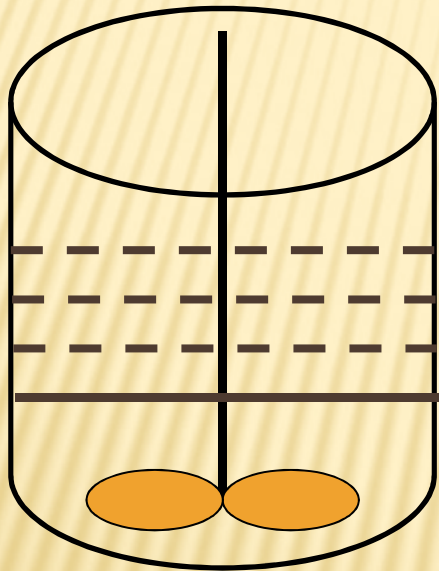


- Aucune entrée ou sortie
- Régime transitoire
- Le volume reste constant et la productivité est relativement faible.

## 2. Mode d'alimentation par Fed batch (discontinue )

Lorsque la cuve est remplie, l'alimentation est coupée

La croissance démarre plus vite étant donné que le volume de culture peut être réduit.



- Alimentation seulement
- Régime transitoire
- La concentration obtenue peut alors être plus élevée

**Mais le risque de contamination est élevé**

**Le fed batch permet en pratique un gain de temps, une augmentation de productivité et une possibilité de modification du milieu en cours de culture**

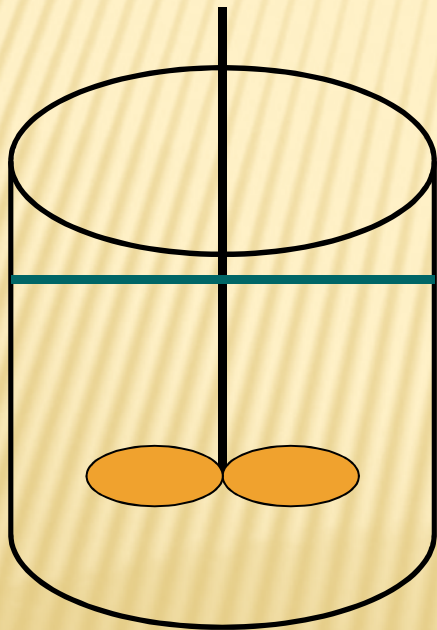


### 3. Mode d'alimentation continu

L'alimentation et le soutirage se fait au même débit lorsqu'une certaine concentration cellulaire est atteinte dans la cuve.

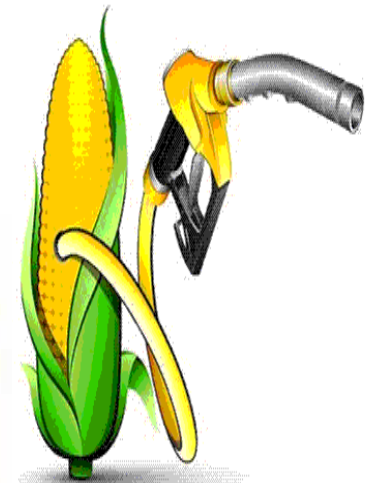
Il n'est pas nécessaire en théorie de vider la cuve

Cependant, des mutations et des contaminations obligent leur vidange

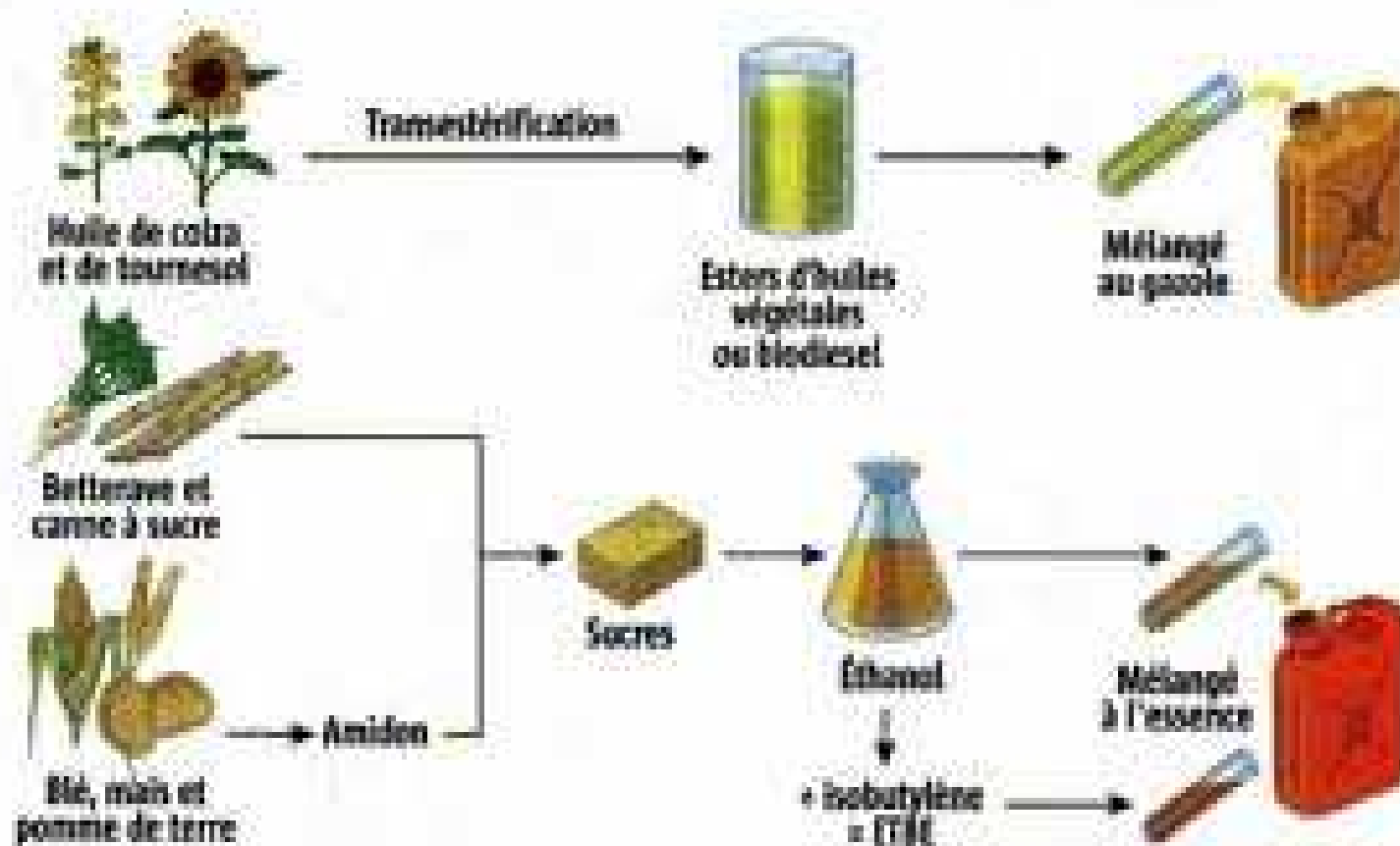


- La productivité est beaucoup plus importante qu'en mode discontinue

# Quelque application sur bioproduction



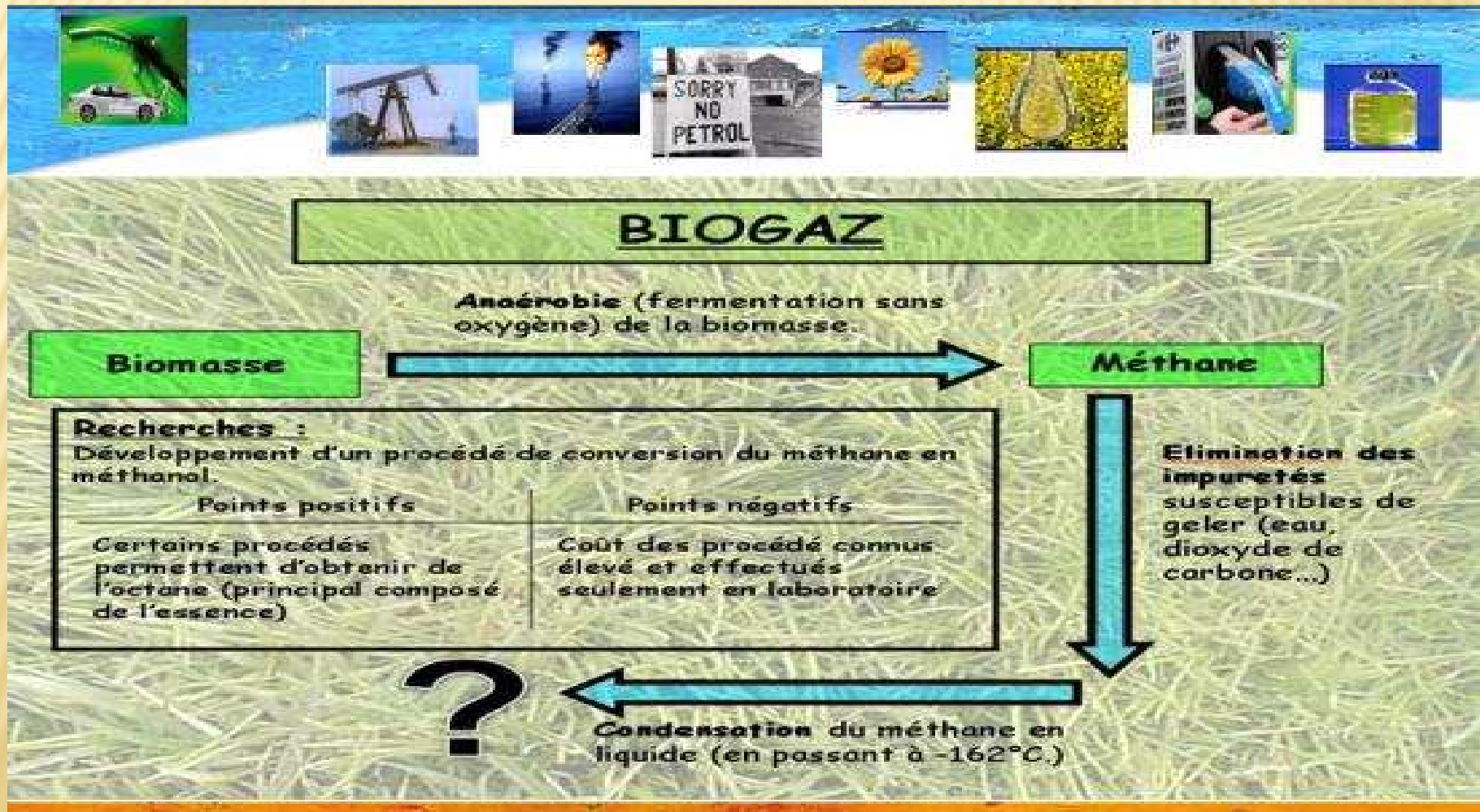
Crédit photo : © Beboy - Fotolia.com.jpg



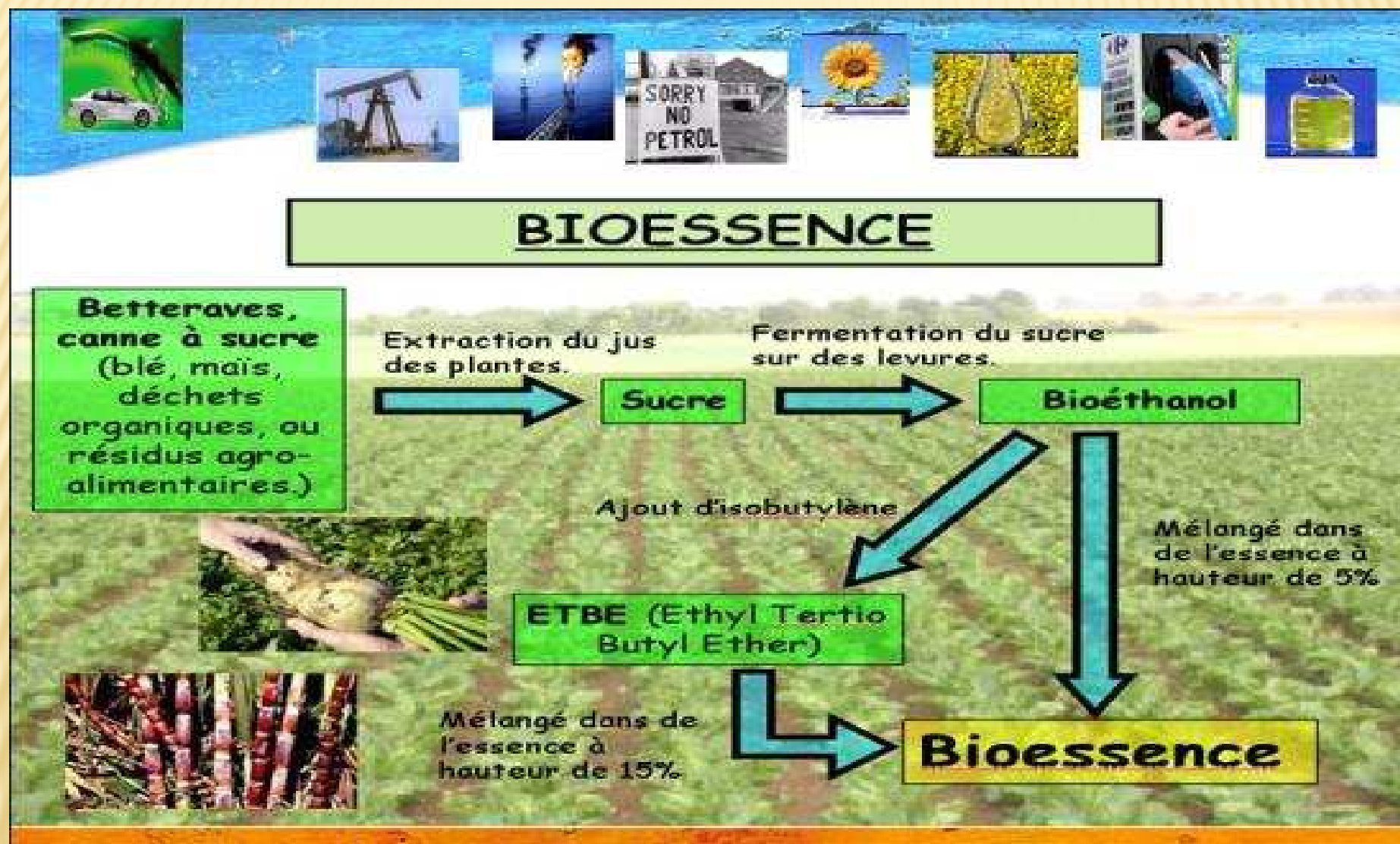
# Les biocarburants

se présentent sous de multiples formes :

La 1<sup>ère</sup> forme est gazeuse et consiste à extraire du biogaz de la biomasse grâce à une fermentation sans oxygène des plantes



Le schéma ci-dessus montre le cheminement des 2 filières les plus développées et utilisées dans le domaine des biocarburants.





# Avantages



La production à très grande échelle de ces carburants verts permettrait la création d'emplois agricoles en quantité absolument énorme, ce qui pourrait contrecarrer les effets de la crise. De plus, cela assurerait une meilleure sécurité énergétique des pays ne possédant pas de pétrole

## Conclusion

---

- La fermentation c'est la production d'énergie sans oxygène
- Beaucoup de cellules se passent d'oxygène ( $O_2$ ) pour "brûler" leur composé organique. Donc au lieu de produire de l'ATP au moyen de la respiration, elles utilisent la fermentation
- La fermentation est donc également une dégradation du glucose mais incomplète permettant une libération partielle de son énergie sous forme d'ATP. La fermentation libère également du  $CO_2$ .
- Sur un plan général, la fermentation est l'emploi de micro-organismes, notamment des levures et des bactéries, pour transformer un hydrate de carbone, tel que du sucre, en alcool ou en acide. La fermentation peut intervenir naturellement dans bon nombre d'aliments et son utilisation dans la production traditionnelle de produits alimentaires et de boissons remonte à des milliers d'années.
- Le bioréacteur (ou fermenteur) permettant d'assurer une croissance des micro-organismes et une production optimale dans un environnement dont les paramètres physiques et chimiques de la fermentation sont contrôlés.

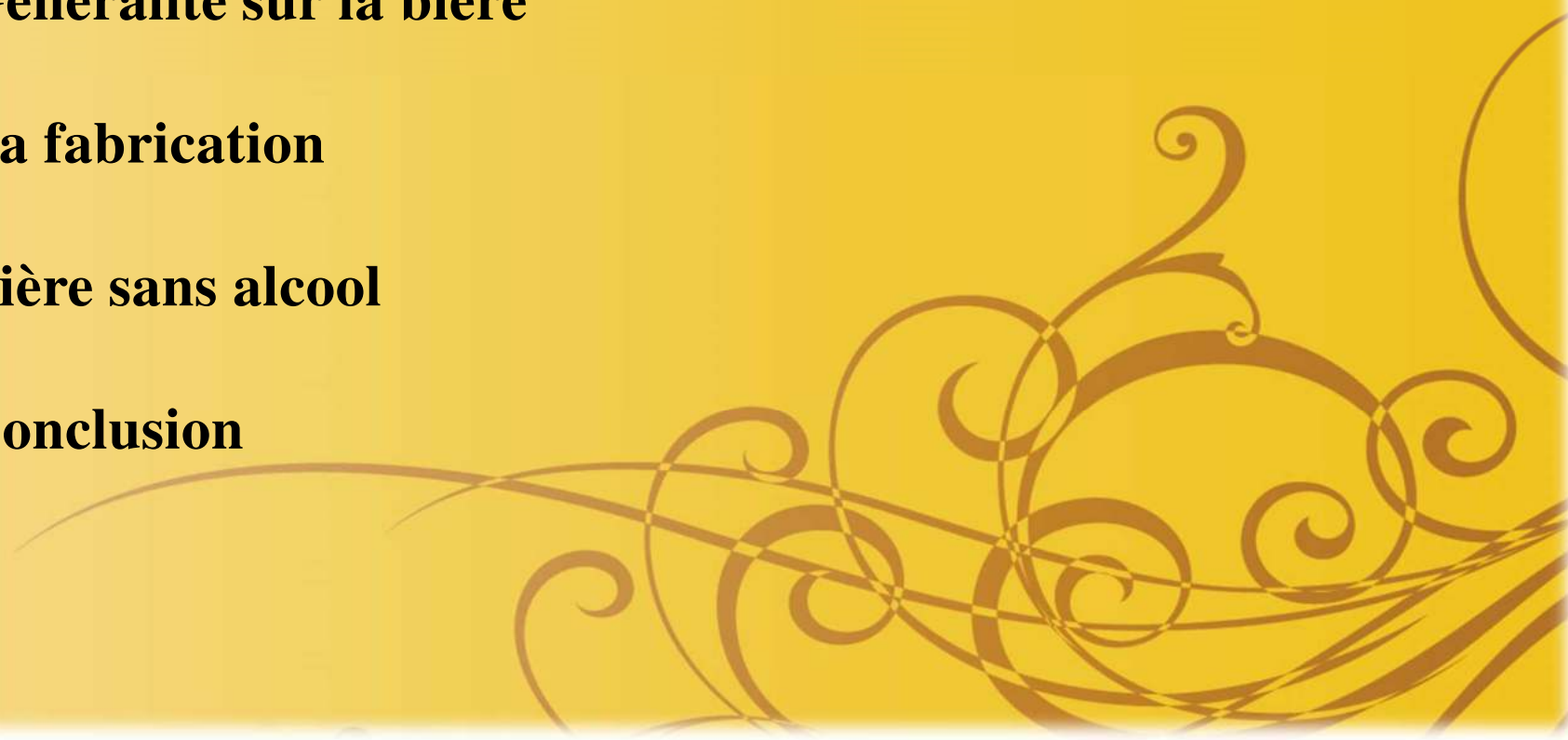
---

# **La brasserie et processus de fabrication**

---

## *Plan du travail*

Plan du travail

- ❖ **Introduction**
  - ❖ **Historique**
  - ❖ **Généralité sur la bière**
  - ❖ **La fabrication**
  - ❖ **Bière sans alcool**
  - ❖ **Conclusion**
- 
- Decorative swirls in the bottom right corner of the slide.



# Introduction

- La fabrication de la bière est aujourd'hui un art bien connu;
- La fabrication de la bière se repose sur deux points de vue:
  - ✦ Avec un point de vue traditionnel → la recette ancestrale de la fabrication
  - ✦ Avec un point de vue innovant → les connaissances scientifiques pour expliquer le processus de la fabrication
- Il existe et existera toujours autant de méthodes de fabrication que de type de bière, et aussi de brasseries dans le monde;
- La bière est bien une boisson mondiale qui a traversé les siècles;
- A l'heure actuelle, des essais de fabrication de boissons à faible teneur alcoolique ont été réalisés. Ces fabrications, dans le cas de la bière, font généralement appel à un processus de fermentation alcoolique modifié, dans le sens d'une diminution qualitative et quantitative, grâce à l'utilisation de moûts, de levures adaptées et de procédés appropriés.

## Historique

On situe l'origine de la bière en *Palestine* vers 8,000 ans AV J.-C., cette dernière était obtenue en faisant macérer de pain d'orge dans l'eau appelle « *SIKARU* » « *Pain liquide* »

### Antiquité

#### Les Babyloniens et les Egyptiens

les babyloniens diversifient la gamme avec au moins de 34 bières différentes recensées

chez les Egyptiens, existaient déjà de véritables brasseries d'Etat, la bière relevant d'un monopole, Le pharaon Ramsès II, surnommé le « pharaon brasseur » proclama des règles très strictes concernant ce breuvage.



## **L'empire romain et les Gaulois:**

**La bière arrive en Europe vers 5000 – 4800 ans AV. J.-C.**

**La bière a été fabriquée et consommée très tôt en Grèce et à Rome, avant d'être il est vrai partiellement remplacé par le vin**

**Pour les Gaulois, la bière est une véritable potion magique. Les Gaulois sont aussi les inventeurs du tonneau permettant de mieux contrôler la fermentation et le stockage de la cervoise**



**Tonneau**



## Le moyen Âge

C'est au 8<sup>ème</sup> siècle que le houblon, plante réputée pour ses vertus antiseptiques, fit une apparition dans la fabrication de la bière et y conféra sa délicieuse amertume.

Aux 14<sup>ème</sup> et 15<sup>ème</sup> siècles, les brasseries se multiplient. La bière devient une boisson populaire.

Au 16<sup>ème</sup> siècle, la Renaissance fut l'âge d'or des brasseurs. Leur corporation était très riche.

Au 17<sup>ème</sup> siècle de nombreuses bières différentes font leur apparition dans l'Europe.



A la fin du 18<sup>ème</sup> siècle, l'arrivée de Napoléon permettra de relancer les activités brassicoles dans le cadre d'une relance générale de l'économie.




**A la fin du 19<sup>ème</sup> siècle, Pasteur aida les brasseurs du Nord de la France (Lille) en expliquant comment éviter les contaminations bactériennes (puisqu'il venait de découvrir l'existence des micro-organismes) en ayant une hygiène stricte lors de la préparation de la fermentation**

## **La révolution industrielle**

**Le développement de la verrerie, des appareils de filtration, du soutirage sous-pression, de l'embouteillage et de la réfrigération permet d'accroître la qualité et la production**

## **De nos jours**

**La fabrication de la bière est maintenant presque totalement automatisée dans la plupart de ses étapes de fabrication, le nombre de brasseries traditionnelles est en déclin. Les nouvelles technologies et la recherche permettent d'obtenir un produit de très bonne qualité**

Decorative swirls in the bottom right corner of the slide.



# Généralité sur la bière

## 1.Définitions

- **La brasserie** : Une brasserie est étymologiquement et historiquement le nom du lieu où est brassée la bière.
- **La bière** : C'est une boisson alcoolisée obtenue par transformation de matières amylacées par voies enzymatiques et microbiologiques.
- **Le Houblon** : « *Humulus lupulus* » c'est une herbe, il remplaça l'utilisation des épices ou des plantes (romarin, laurier) dans l'aromatisation de la bière.
- **Le malt** : Le malt est une céréale germée, en général de l'orge, qui est caramélisée, pour qu'elle dégage tous ses arômes.



## **2. Classification de la bière**

**En fonction du degré alcoolique. D'après Mulder J., 1861 :**

- **Bière sans alcool (moins de 1,2 % Vol.).**
- **Bière bock et de table (jusqu'à 3,9 % Vol.).**
- **Bière de luxe (entre 4,4 % Vol. et 5,4 % Vol.).**
- **Bière spéciale (plus de 5,5 % Vol.).**

**En fonction de la couleur:**

**Les différents types de la bière selon la couleur : de gauche à droite :  
bière blanche - bière pale - bière blonde - bière rousse - bière ambrée - bière brune**





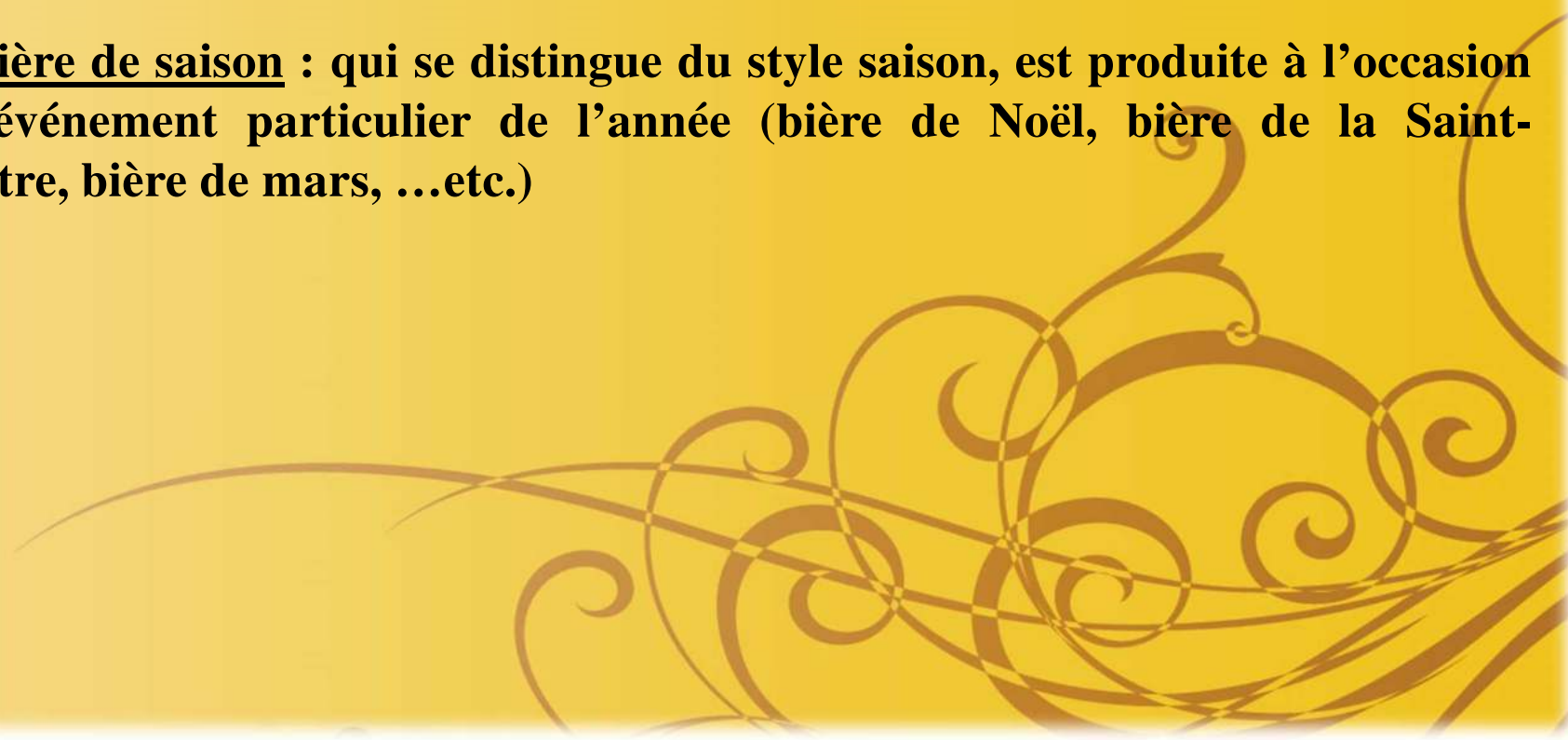
## **En fonction du type de fermentation:**

- **Les bières de fermentation basse** : sont couramment appelées légers.
- **Les bières de fermentation haute** : sont appelées ales. Ces dernières ont des arômes plus complexes et peuvent atteindre un degré d'alcool plus élevé.
- **Les bières de fermentation spontanée** : sont par contre fermentées grâce à des levures sauvages présentes naturellement dans l'air environnant.
- **Les bières de fermentation mixte** : combinent la fermentation haute et la fermentation spontanée

## **En fonction du goût :**

- Les douces.
- Les amères.
- Les acides.
- Les liquoreuses.
- Les saugrenues (surprenantes et inclassables).

**En fonction de leurs caractéristiques particulières :**

- **La bière d'abbaye** : porte le nom d'une abbaye mais elle est de nos jours généralement fabriquée en dehors de celle-ci. Certaines abbayes prêtant leur nom à ces bières qui n'existent plus, ou n'ont même jamais existé.
  - **La bière de saison** : qui se distingue du style saison, est produite à l'occasion d'un événement particulier de l'année (bière de Noël, bière de la Saint-Sylvestre, bière de mars, ...etc.)
- 
- A decorative graphic consisting of several overlapping, swirling lines in a darker shade of yellow, located in the bottom right corner of the slide.

### 3.Composition



**Le malt** : renferme en effet un taux de sucres fermentescibles plus élevé et permet d'obtenir une bière au goût plus pur.



**L'eau** : constitue 80 à 90 % de la bière. Ses qualités déterminent la clarté et le goût de la bière. Elle encourage le malt et le houblon à libérer leurs sucres et arômes.



**Le houblon** : contient des acides qui stabilisent la bière et lui procurent son amertume ainsi que des huiles essentielles qui enrichissent sa palette aromatique.



**La levure**: ce micro-organisme unicellulaire permet de transformer les sucres en alcool et en gaz carbonique, mais aussi de développer des arômes

# La fabrication de la bière

## La fabrication de la bière

**Avant de commencer il peut être intéressant de connaître la durée approximative des étapes du brassage :**

- **Le brassage : 1 à 5 heures**
- **La fermentation primaire : 1 semaine**
- **La fermentation secondaire : 1 à 3 semaines**
- **L'embouteillage : 1 heure**
- **La re-fermentation en bouteille : 1 à 2 semaines**
- **La maturation de la bière : >1 mois**



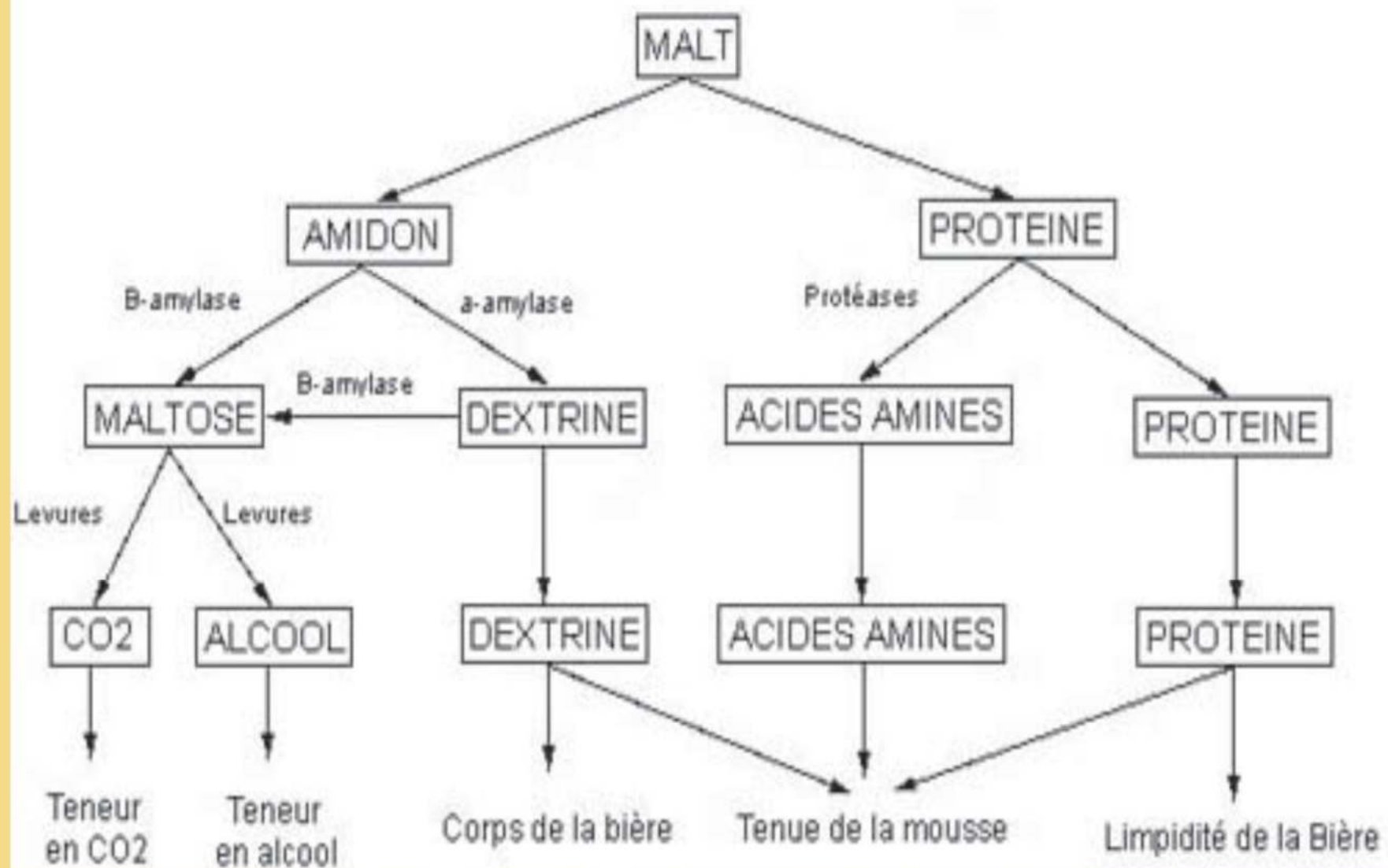
## **Le maltage**

**Le maltage a pour but de développer dans l'orge toutes les enzymes nécessaires (cytase, amylases, phosphatases, protéinases, peptidases) pour le brassage ultérieur. De plus, il doit donner au grain sa friabilité pour permettre la transformation de l'amidon en glucose. Finalement, le maltage doit donner à l'orge un arôme plus développé**



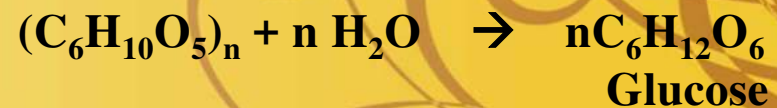
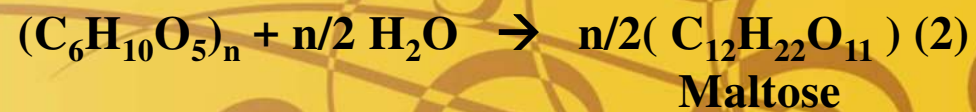
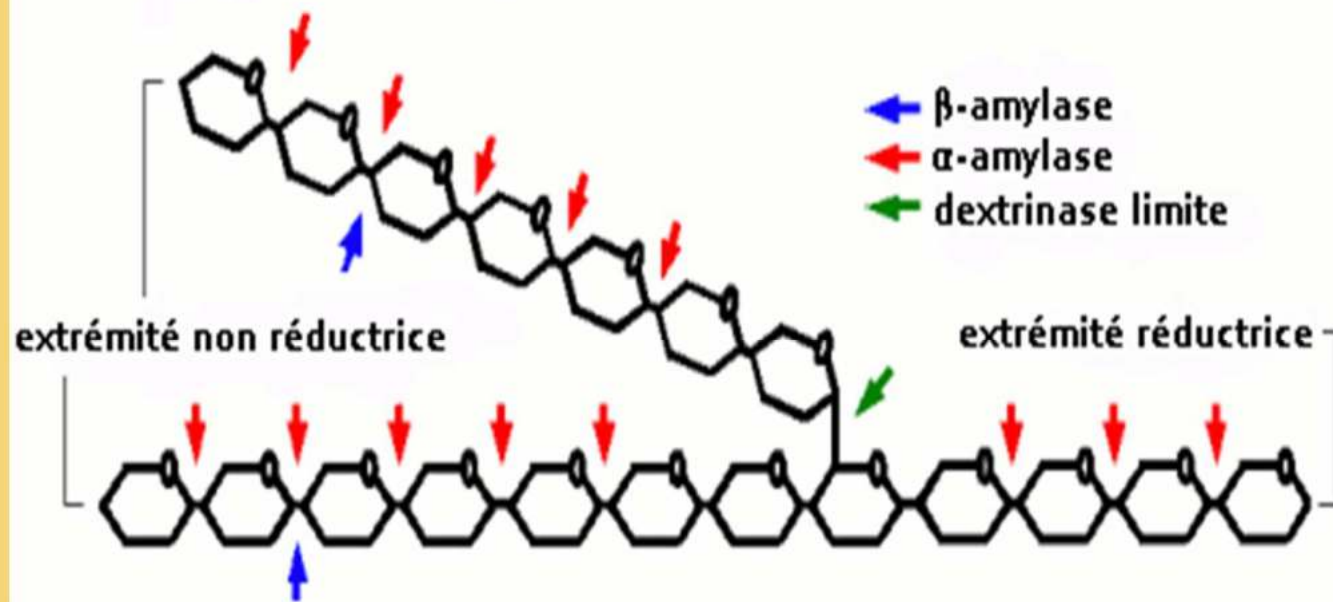






## Rôle de la température :

Température (°C)	Temps (min)	Enzymes	Résultats
50°C	15 à 20 min	Protéinases	Peptides et acides aminés plus simple
60°C	20 à 45 min	Béta-amylases	Maltose fermentescible par les levures
> 65°C	20 à 45 min	Alpha-amylases	Sucres non fermentescibles
75°C	15 min		Arrêter le travail des enzymes



## La filtration du moût

- Le moût est passé dans plusieurs filtres, et ce qu'il en reste (appelé drêche) est lavé avec de l'eau chaude puis séché, afin d'être utilisé comme nourriture pour le bétail .



**Cuve filtre**



**Filtre - presse**

## Cuisson et houblonnage

- C'est à ce moment que l'on ajoute le houblon et certains arômes, alors que le moût est cuit 2h dans un bassin. Les enzymes de malt sont alors détruites et le stérilisent, pour stabiliser le moût. Les substances azotées forment une écume et sont prélevées pour être utilisée comme engrais .



# La fermentation

La fermentation est déclenchée par l'ensemencement par des levures du genre *Sacharomyces* parfaitement caractérisées et provenant de laboratoires. Les oses et les diholosides vont subir la fermentation alcoolique.

On distingue :

**1 - La fermentation principale** (99 % des sucres fermentescibles) qui peut se faire par :

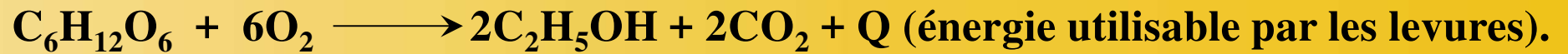
- La fermentation basse à 10 – 15 °C, pendant une semaine environ, par l'espèce *Sacharomyces uvarum*. La levure se dépose au fond des cuves (basse).
- La fermentation haute, en 3 à 4 jours à 20 – 25 °C par *Sacharomyces cerevisiae*, qui reste en surface (haute).

**2 - La fermentation secondaire** ou de garde dans des tanks hermétiques durant 3 à 8 semaines à une température abaissée à 0 – 1 °C.



## L'équation de la fermentation

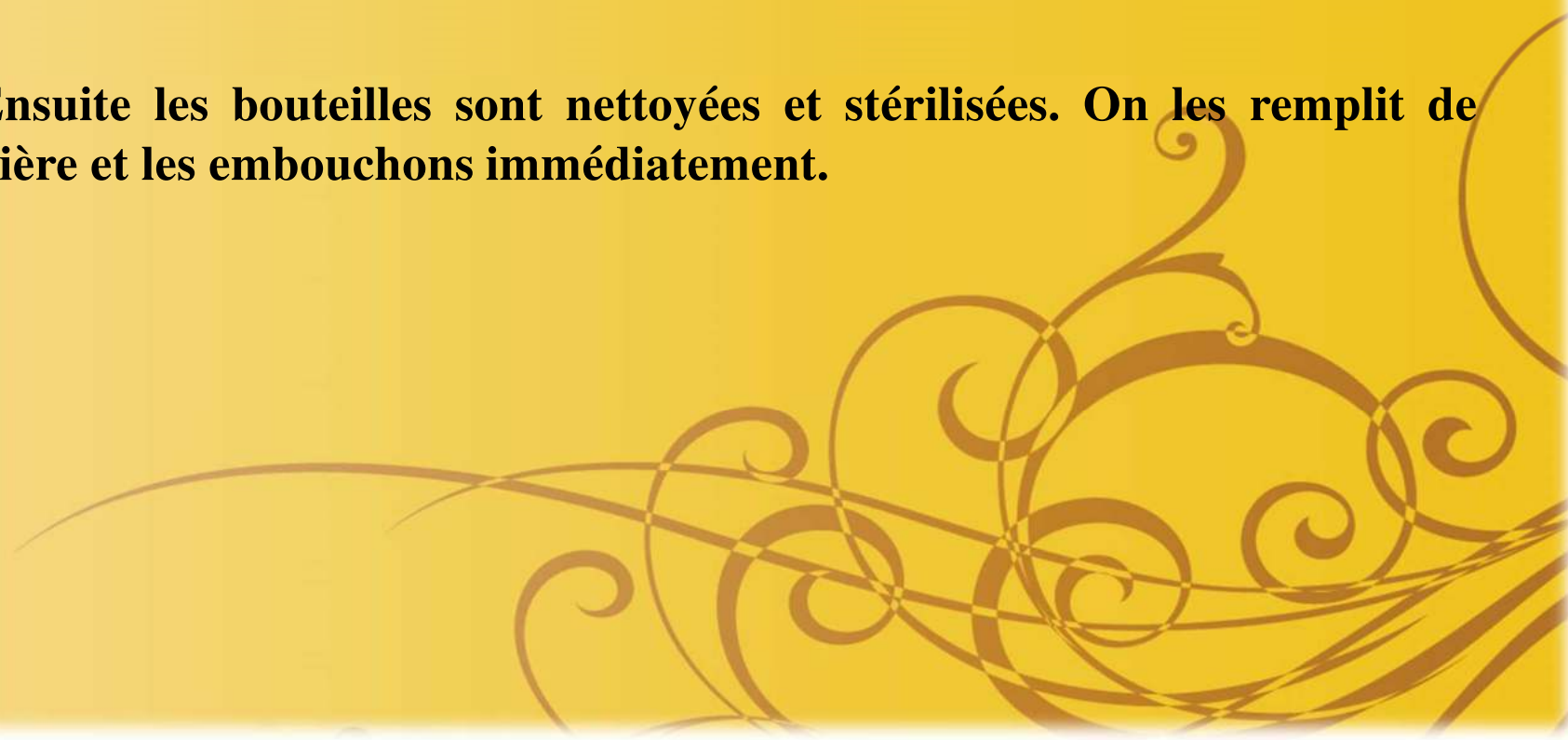
Levures



Glucose + dioxygène  $\longrightarrow$  éthanol + dioxyde de carbone + chaleur



# **La filtration et l'embouteillage**

- **La bière est filtrée par des centrifugeuses .**
  - **Après cela, elle est passée dans divers filtres, toujours sous pression pour ne pas perdre de gaz carbonique.**
  - **Ensuite les bouteilles sont nettoyées et stérilisées. On les remplit de bière et les embouchons immédiatement.**
- 
- A decorative graphic consisting of several overlapping, swirling lines in a light brown color, located in the bottom right corner of the slide.

1. Cuve à  
trempier

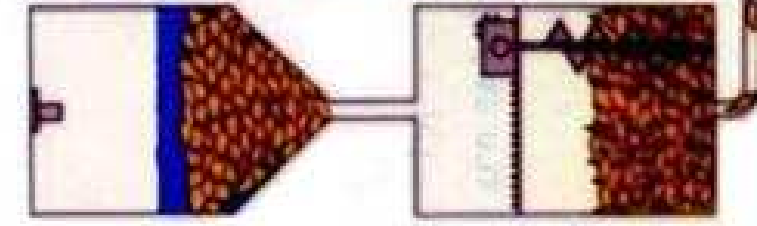
3. Touraille

5. Cuve  
matière

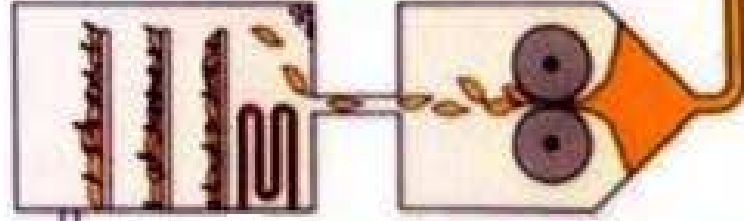
7. Chaudière à moût

9. cave  
de  
garde

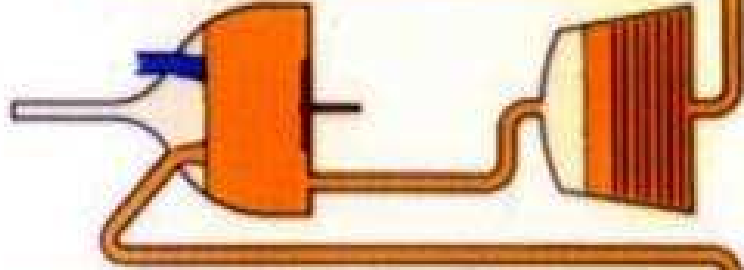
11. Soutirage



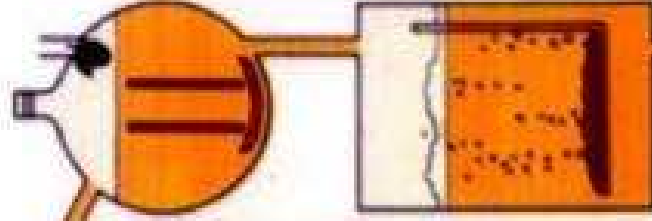
2. Germeoir



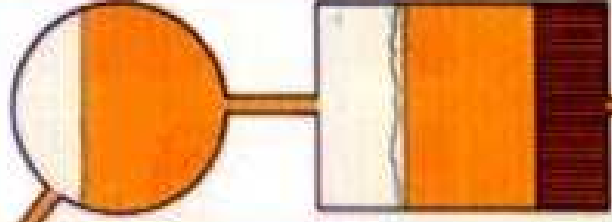
4. Concasseur à  
malt



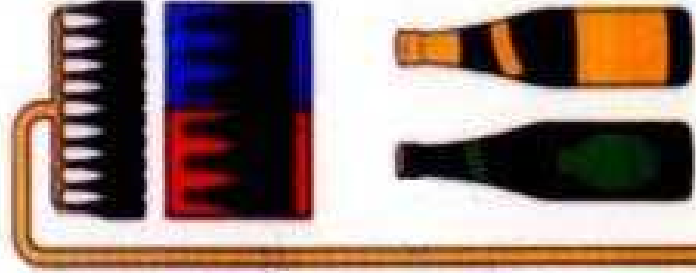
6. Cuve  
filtre



8. Cuve de  
fermentation



10. Filtre



12. Étiquetage

## Bière sans alcool

BIÈRE SANS ALCOOL

### Définition

**La bière désalcoolisée ou sans alcool est définie comme étant une boisson faiblement alcoolisée dont le taux d'alcool ne dépasse pas les 1,2% ( $\leq 1,2\%$ ).**



## **- Procédé de fabrication de la bière sans alcool :**

**Il existe plusieurs techniques d'obtention de la bière sans alcool :**

### **1) Fermentation contrôlée**

#### **a) fermentation interrompue :**

**La fermentation principale est interrompue après une durée de 4 à 5 jours.**

#### **b) fermentation par des microorganismes autres que les levures industrielles :**



## **2) Dilution de bière fermentée avec un mout non fermenté.**

Les boissons ainsi préparées ont beaucoup de ressemblance (teneur en éléments nutritifs) avec la bière mais ne peuvent la remplacer (goût...).

## **3) Dilution du mout de la bière avec de l'eau gazéifiée.**

C'est la même technique que celle pratiquée pour l'obtention de la limonade, la bière obtenue est du genre limonade.

## **4) Désalcoolisation de la bière normale par évaporation.**

**a) Distillation à pression atmosphérique**

**b) Distillation sous vide**

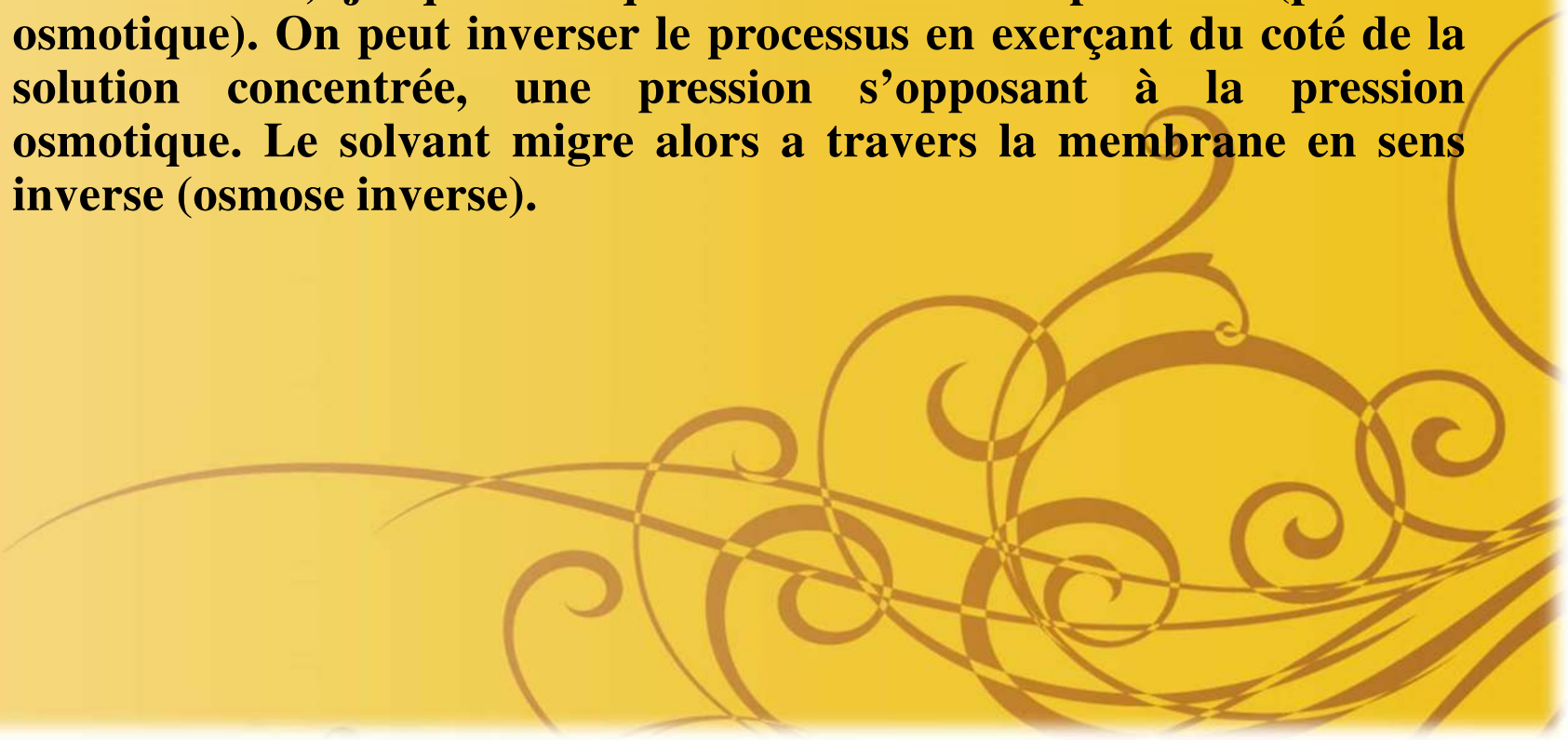
A decorative graphic consisting of several overlapping, swirling lines in a light brown or tan color, located in the bottom right corner of the slide. The swirls are elegant and fluid, resembling stylized calligraphy or a modern logo element.



## 5) Osmose inverse

### Définition

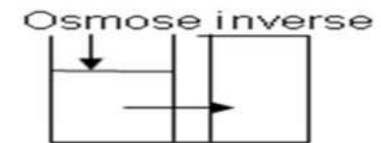
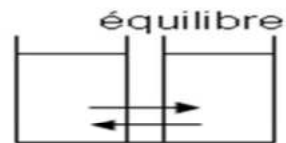
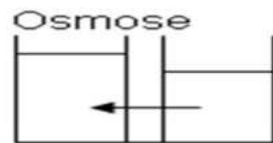
L'osmose est l'échange de substances dissoutes à travers une membrane perméable jusqu'à l'obtention de l'équilibre des concentrations de part et d'autre avec une membrane semi-perméable. En effet le solvant migre du côté de la plus forte concentration, jusqu'à ce que s'établisse une pression (pression osmotique). On peut inverser le processus en exerçant du côté de la solution concentrée, une pression s'opposant à la pression osmotique. Le solvant migre alors à travers la membrane en sens inverse (osmose inverse).

Decorative swirls in the bottom right corner of the slide.

## b- Principe

Si on applique une pression sur la solution concentrée (bière), la quantité d'eau transférée par osmose va diminuer. Avec une pression suffisamment forte, le flux d'eau va même s'annuler ; cette pression est nommée la pression osmotique (P). Si on dépasse la valeur de la pression osmotique, on observe un flux d'eau dirigé en sens inverse du flux osmotique : c'est le phénomène de l'osmose inverse.

Schéma expliquant le principe de l'osmose inverse



**Il est possible de réduire les teneurs en alcool de bière au degré désiré on utilisant l'osmose inverse avec des membranes en acétate de cellulose et des dilutions appropriées. Mais il faut noter que :**

- une quantité importante des composés aromatiques est perdue durant la réduction de l'alcool.**
- une quantité de substances azotées et de polyphénol est perdue**

## Comparaison entre la bière et la bière sans alcool

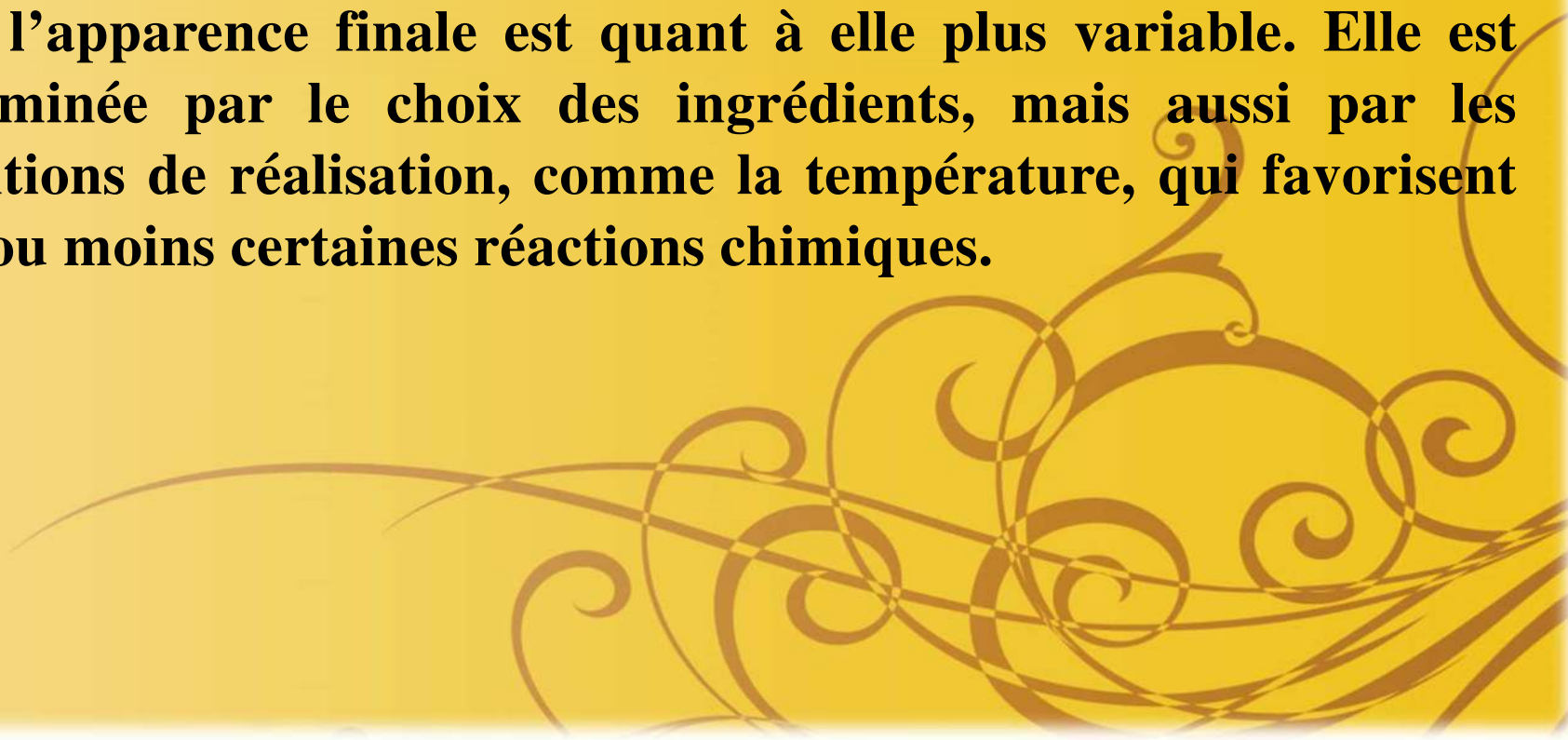
Critères de comparaison	bière	Bière sans alcool
Taux d'alcool	>04	Ne dépasse pas 1.2%
Valeur énergétique	110 kcal/100ml	27Kcal/100ml
Valeur nutritionnelle	Dextrine : 27g/l Maltose : 13g/l Protéines : 5g/l	24g/l 32g/l ≤5
vitamines	B5 : 1mg/l B6 : 0.2mg/l B2 : 0.04mg/l B12 : traces	Différence non significative
minéraux	K : 300 à 700mg/l P : 18 à 131 mg/l Mg : 70 à 135mg/l	Valeurs proches
gout	habituel	différent
Teneur en CO <sub>2</sub>	Forte teneur	Faible teneur

## Conclusion

Le point de départ de la fabrication de bière est le choix de matières premières de qualité. Les quatre ingrédients indispensables sont l'eau, l'orge, mais également la levure et enfin le houblon. Les levures sont la base même de la fermentation, donc de la production d'alcool. Après la réunion de tous ces ingrédients, il est indispensable de respecter un processus de fabrication bien défini. L'absence ou le mauvais déroulement d'une des quatre étapes aura des répercussions sur le reste de la fabrication. Il y a tout d'abord le maltage, qui vise à reproduire les conditions idéales de développement du grain d'orge afin qu'il produise des enzymes. Ces enzymes permettent alors de désagréger les parois cellulaires du grain et d'accéder ainsi aux réserves d'amidon.



**C'est ensuite lors du brassage que l'amidon est transformé en sucres fermentescibles, grâce à l'activité enzymatique. Sans ces deux étapes essentielles, lors de la fermentation les sucres ne pourront être transformés par les levures en éthanol, gaz carbonique et autres métabolites contribuant notamment à l'arôme final de la bière. Outre le degré d'alcool, la composition de cette boisson est très similaire pour tous les types de bière, mais l'apparence finale est quant à elle plus variable. Elle est déterminée par le choix des ingrédients, mais aussi par les conditions de réalisation, comme la température, qui favorisent plus ou moins certaines réactions chimiques.**

The bottom right corner of the slide features a decorative graphic consisting of several overlapping, swirling lines in a golden-brown color, creating an elegant, vine-like pattern.

# Les levures et levain

## Préparation et performance en panification

# Plan de travail

- **Introduction**
- **Historique**
- **Les levures:**
  - Définition
  - Le développement de la levure
  - Fabrication de la levure de boulangerie
  - Les différentes formes de levure boulangère
  - Paramètres influençant l'activité levurienne
  - Conservation de la levure et utilisation
  - Action de la levure en panification
- **Le levain:**
  - Définition
  - Facteurs influençant l'activité des levains
  - Création d'un levain artisanale
  - Les rafraîchissements de levain
  - Méthodes de conservation de levain
  - Panification sur levain
  - Avantages et inconvénients du levain
- **Conclusion**



# Introduction

**Les levures jouent un rôle important dans la vie humaine depuis les anciennes civilisations du monde antique, elles sont responsables de la fermentation dans la plupart des industries alimentaires pour fabriquer des produits laitiers (fromage) et l'industrie de fabrication d'alcool ou de boissons alcoolisées.**

**Certains types de levure ont commencé à être utilisé au début du siècle dernier comme une source primaire d'antibiotiques, comme la pénicilline.**



A blue scroll graphic with a white outline, featuring a rolled-up top and bottom edge. The word "Historique" is written in white, bold, sans-serif font across the center of the scroll.

# Historique

## Une histoire qui a commencé il y a 5000 ans...

- Les Égyptiens utilisaient déjà la levure pour fabriquer leur pain, il y a cinq mille ans.

Cependant, ils ignoraient le processus de fermentation de la levure et pour eux, cette réaction chimique relevait du miracle.

- En 1857, Louis Pasteur découvre le principe de la fermentation.



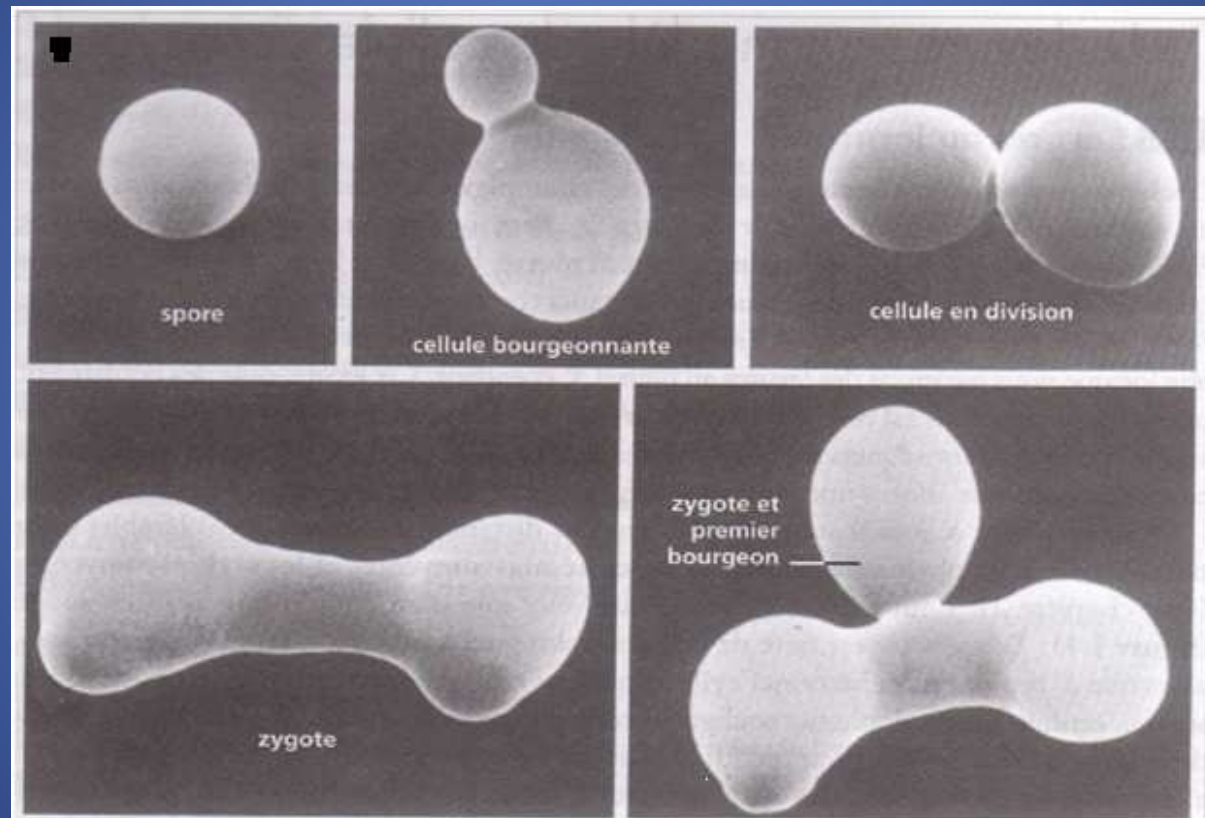
# Les Levures

# Définition

Ce sont des champignons microscopiques unicellulaires appartenant au phylum des **ascomycètes** qui se multiplient par bourgeonnement ou sporulation, ayant la capacité de fermenter des matières organiques, animales ou végétales pour produire des substances variées. Les levures sont courantes dans la nature, dans le sol et sur les plantes.

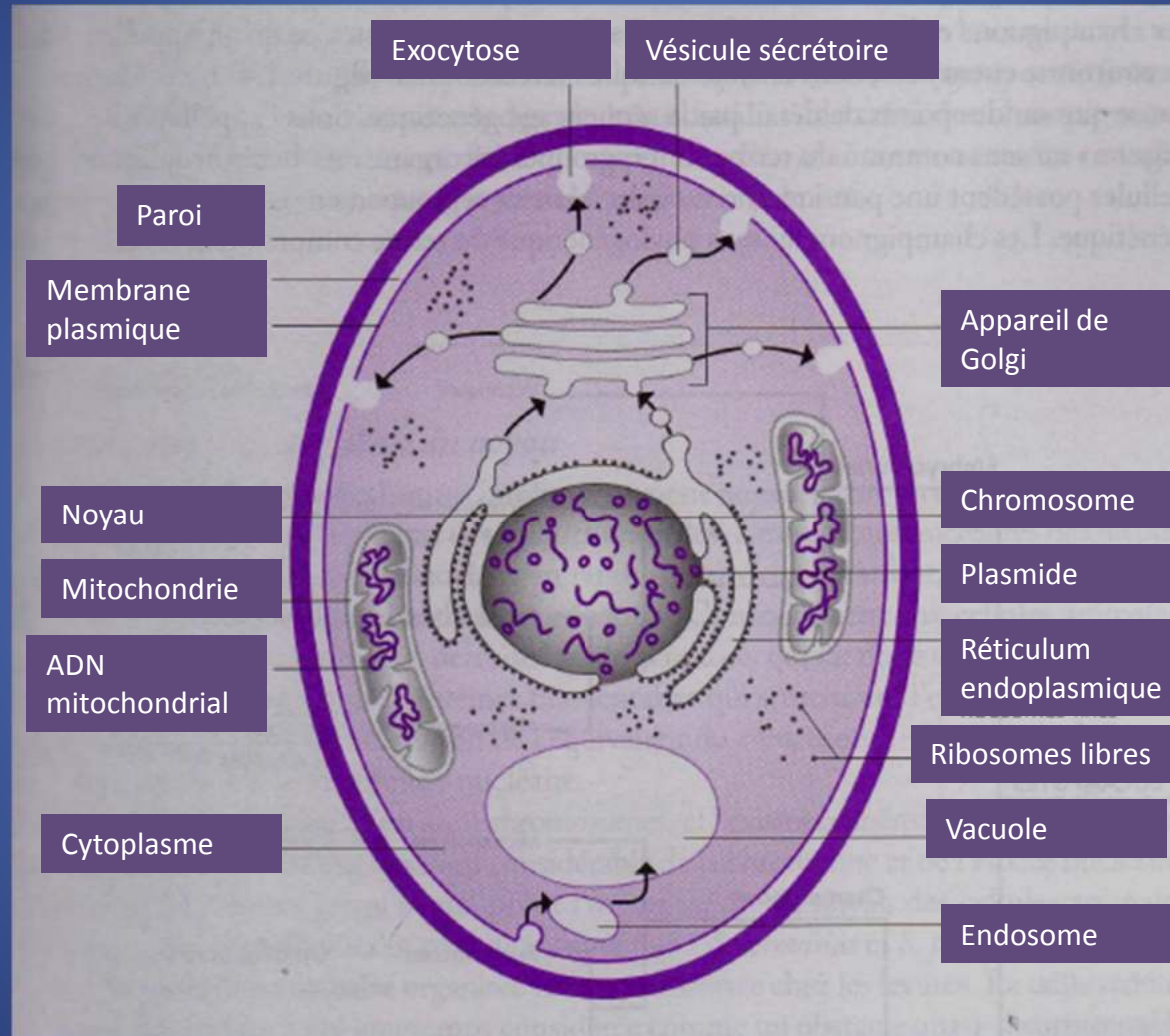
La levure de bière et la levure de boulanger, appartiennent au genre **Saccharomyces** (***Saccharomyces uvarum***, ***Saccharomyces cerevisiae***). Il existe beaucoup d'autres genres de levures ; parmi les plus connues, le genre ***Candida*** possède un pouvoir pathogène chez l'homme, responsable des **mycoses** de type **candidoses**.

# Multiplication de levure (*Saccharomyces*) par bourgeonnement





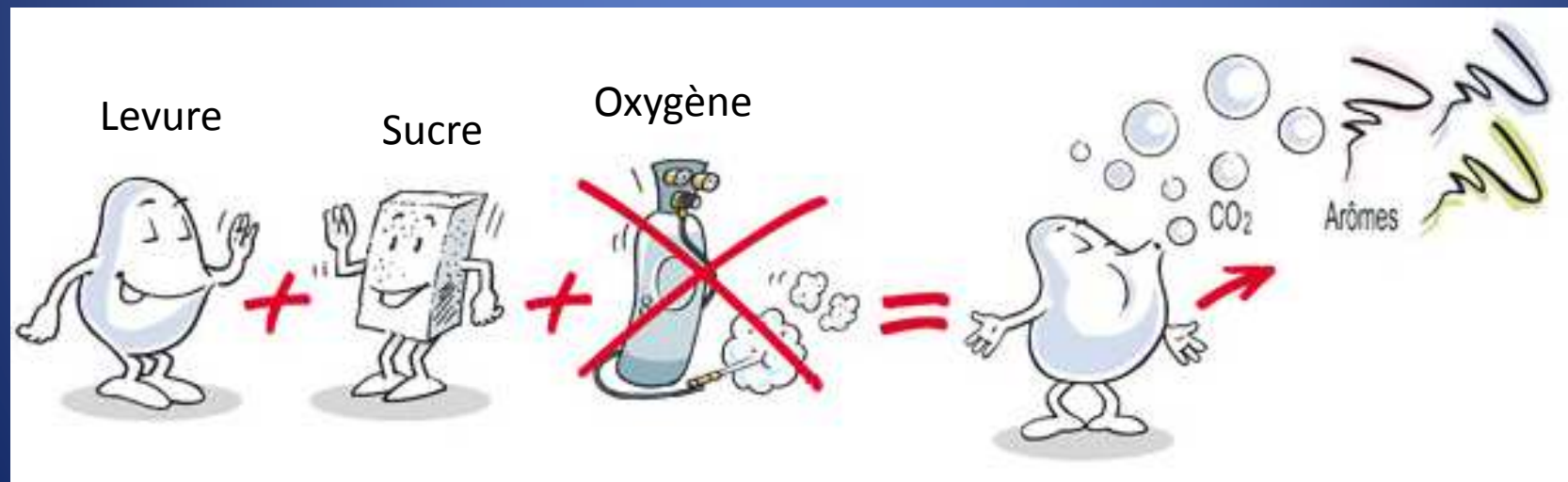
# Présentation d'une cellule de levure



# Le développement de la levure

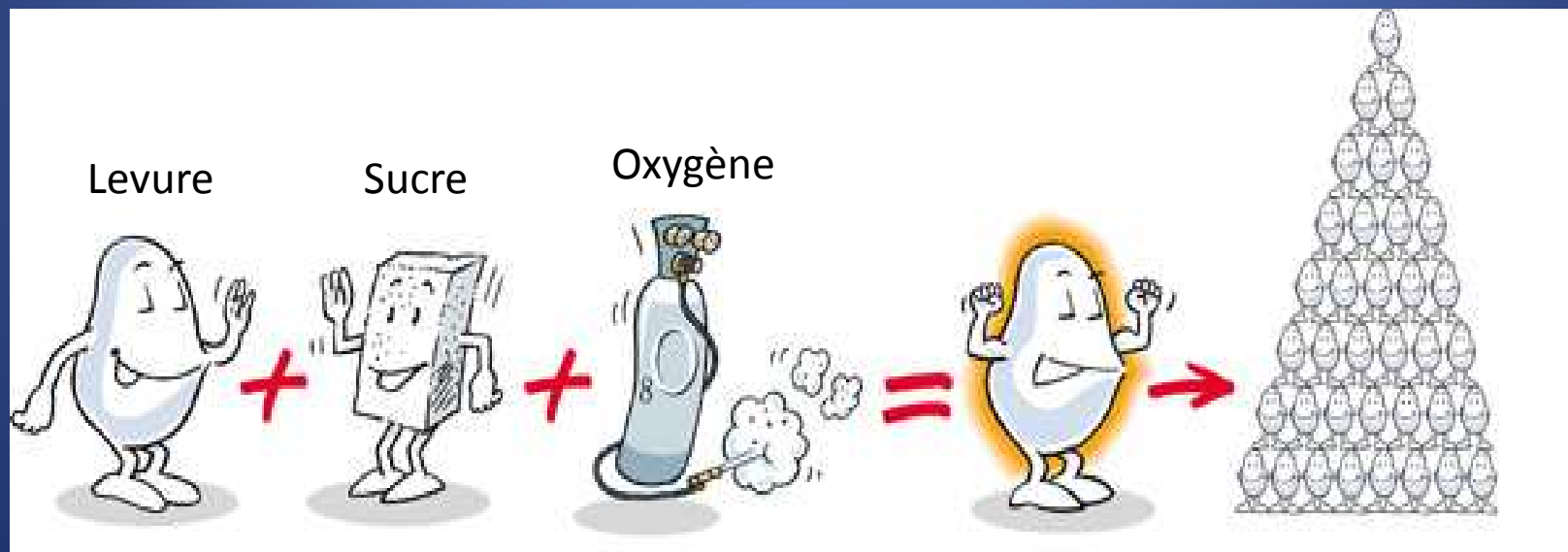
- Sans air

En anaérobiose : le sucre est en grande partie transformé en alcool au détriment de l'énergie libérée. La multiplication des cellules est faible.

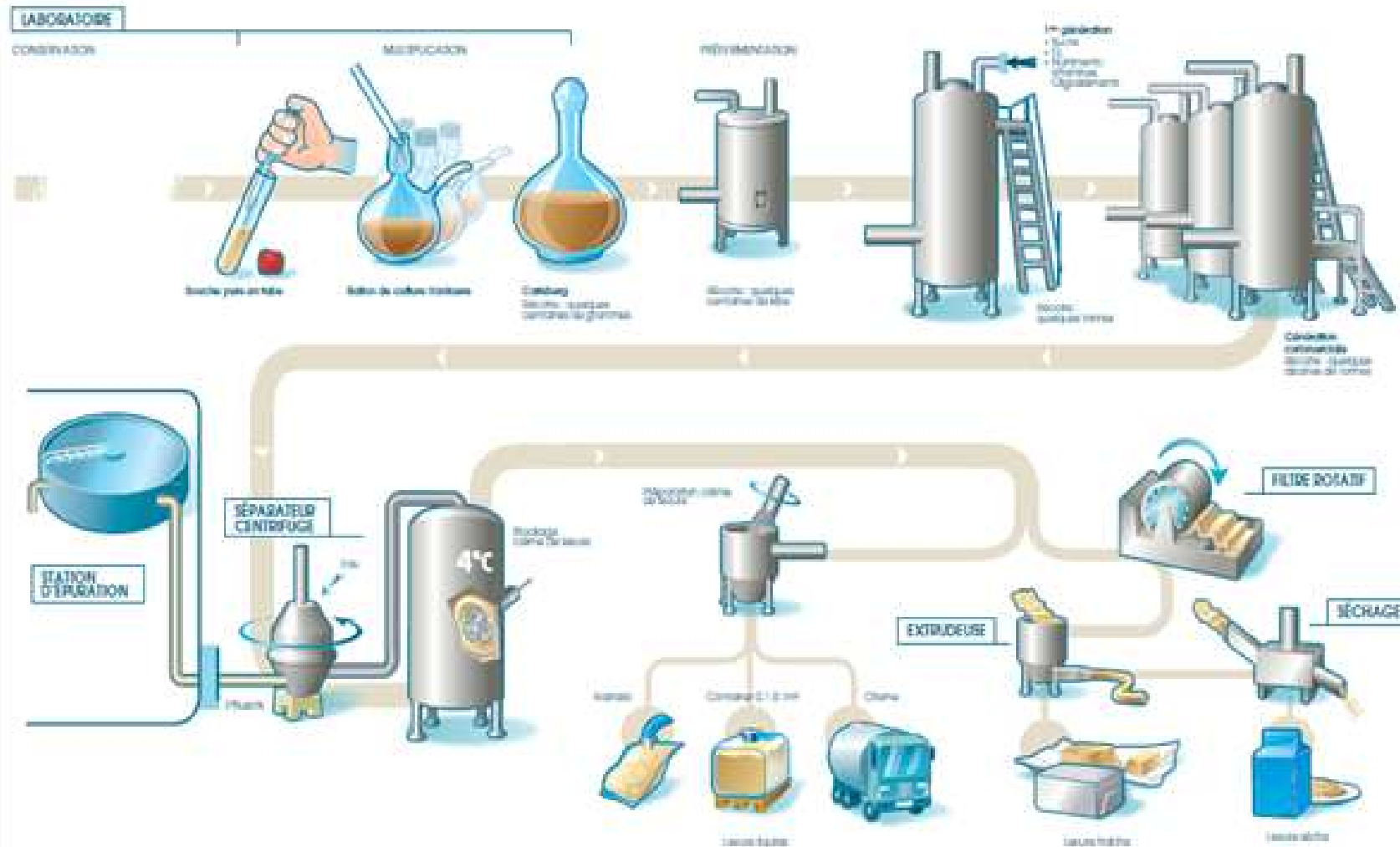


- **Avec air**

**En aérobiose** : les levures respirent et se multiplient abondamment au dépend du glucose, mais sans formation d'alcool.



# Fabrication de la levure de boulangerie





# Les différentes formes de levure boulangère

La levure liquide



La levure pressée



La levure émiettée



La levure sèche active



La levure sèche instantanée

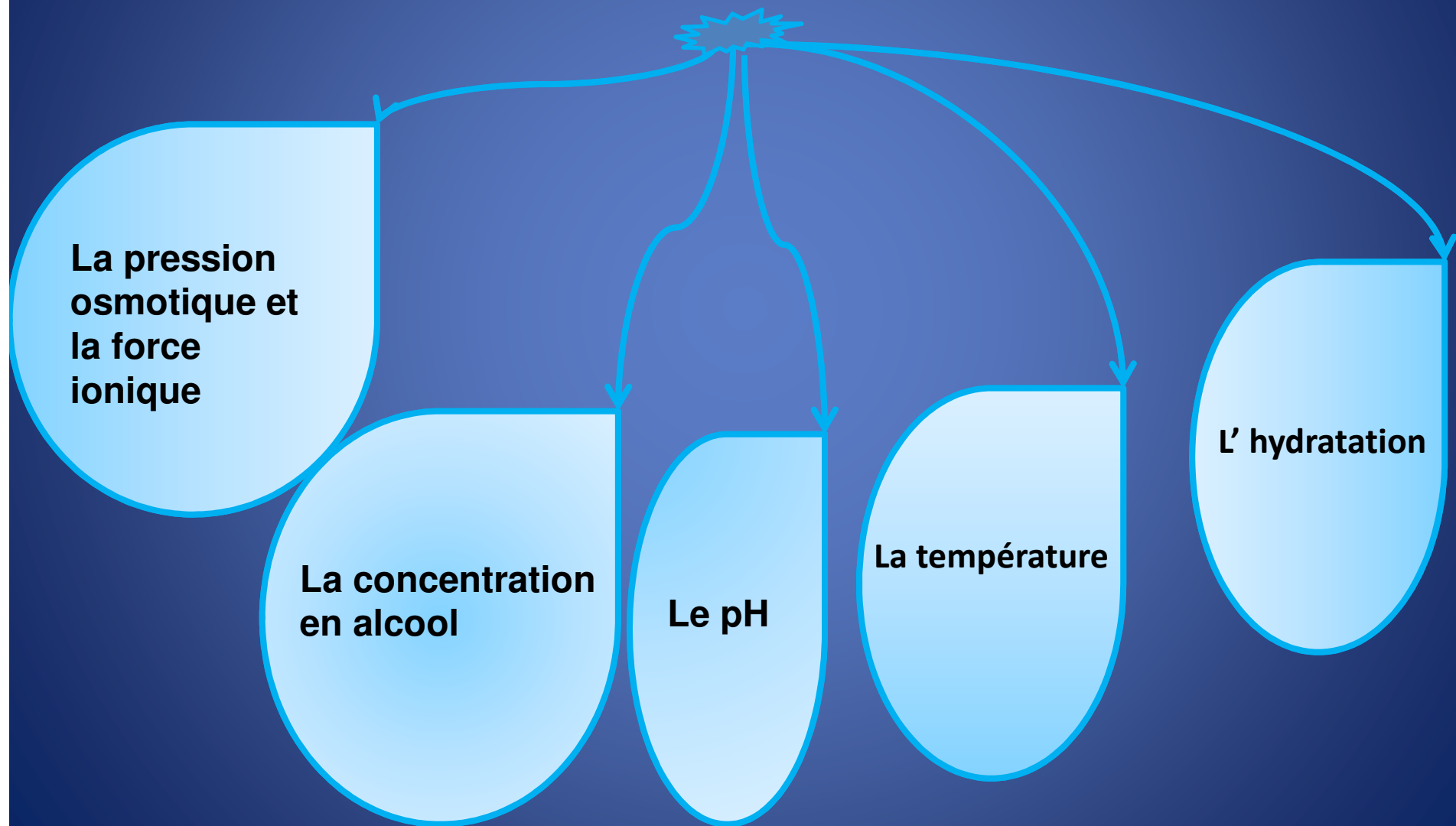


La levure sèche à humidité intermédiaire surgelée





# Paramètres influençant l'activité levurienne



# Conservation de la levure

- La levure doit être stockée en enceinte réfrigérée, moins de 10 °C (de préférence 4 °C).
- Il est également très important de lui préserver son emballage d'origine afin de la protéger de l'air et de l'humidité qui sont des facteurs de détérioration des propriétés de la levure.

# L'utilisation de levure

- ❑ Dans la fabrication du pain et du vin
- ❑ Dans une grande variété de procédés de fermentation industrielle
- ❑ Comme source de vitamines B et de thiamine.
- ❑ Dans certaines étapes de la production d'antibiotiques et d'hormones stéroïdes
- ❑ Pour fabriquer des aliments pour animaux.

# Action de la levure en panification

Son activité débute dès son incorporation dans la pâte et s'arrête 5 min après le début de la cuisson.

Au cours du pétrissage et en aérobiose, les cellules se multiplient rapidement, durant le pointage, la levure produit du  $\text{CO}_2$  mais également beaucoup d'alcool, ce qui se traduit par un développement des arômes et parallèlement une diminution du pH (acidification).

Après 1h d'activité, les sucres simples préexistants dans la farine sont consommés. Elle poursuit alors son action grâce au maltose provenant de l'hydrolyse de l'amidon.

Durant l'apprêt, la production de  $\text{CO}_2$  est plus importante, elle s'accroît encore au cours des premières minutes de cuisson jusqu'à 50 °C.



# Le Levain



# Définition

Le **levain** est une levure naturelle obtenue par une culture symbiotique de bactéries lactiques (Lactobacille) et de levures se développant dans un mélange de farine complète et d'eau. La pâte obtenue sert à la fabrication du pain au levain.

**L'hydratation  
des levains**

**Association température /  
hydratation**

**La température**

## **Facteurs influençant l'activité des levains**

**La composition  
du milieu**

**L'oxygénation  
du milieu**

**L'acidité du  
milieu**

**Le sel**

# Création d'un levain artisanale

Le levain naturel est appelé « le chef », il est possible de démarrer un levain sur différents produits de base et différentes liquides:

- Le **produit de base** : une farine de préférence de qualité bio : de blé, de seigle, de sarrasin, pomme de terre, pomme (fruit) râpée, pois chiches cuits écrasés...
- Le **liquide** peut être : de l'eau (de source de préférence), du jus de fruits (raisins, pommes...), du lait...

Il est possible, mais pas du tout obligatoire, de rajouter du sucre.

**Préparation:** Il faut 10 jours environ pour faire naître un levain :

- 300 g de farine complète.
- 300 g d'eau (non chlorée, prendre de l'eau de source ou minérale) .
- Pétrir et laisser reposer 3-5 jours a l'air ambiant de température 20-25°C, dans un récipient couvert d'un linge (respirant).



Attendre la prise de volume (fermentation):





# Les rafraîchissements de levain

- ✓ **"Rafraîchir"** signifie nourrir de levain, en lui donnant même poids de la farine et de l'eau chaque 2-3 jours pendant 10 jours à température ambiante.
- ✓ Cette opération multiplie les ferments et développe l'acidité et donne la force au levain .
- ✓ A partir du moment où le levain bulle bien et sent cette odeur aigrelette, c'est qu'il est bien actif.
- ✓ Si des traces de moisissures apparaissent, il faut le jeter et en refaire, il a été « contaminé ».

# Méthodes de conservation le levain



Les plaques de levain



# Panification sur levain

La quantité de levain à mettre dans le futur pain varie suivant les goûts et les levains.

En général, on dose tous les ingrédients en proportion de la farine, et non de l'eau :

poids de levain = 20 à 40 % du poids de farine (environ 30 %).

poids d'eau = 45 à 80 % du poids total de farine.

Mélanger tout les ingrédients: farine, eau, sel et levain; puis malaxer, la pâte peut être pétrie à la main, ou à la machine à pains.

laisser reposer la pâte de préférence près d'une source de chaleur (au moins 20 °C) .

Le temps de levée environ 5 à 6 heures, voire même une nuit à 20°C.

A ce stade la pâte subit une première fermentation ou "**pointage**", à température ambiante. Les microorganismes présents, levures et bactéries lactiques se multiplient.

Façonner le pain et remettre à lever environ 1 ou 2 heures avant d'enfourner.

Après la nouvelle levée du pâton, la cuisson se fait pendant 35 minutes à 240 °C.



# Avantages et inconvénients du levain par rapport à la levure de boulanger

## Inconvénients :

- Texture compacte et dense, plus « élastique » .
- La panification est plus longue .
- Le pain lève deux à trois fois moins vite .
- Risques d'échecs.

## Avantages:

- Meilleure assimilation des minéraux et pain plus digest.
- Pain plus aromatique.
- Meilleure conservation du pain.



A blue scroll graphic with a white outline, featuring a rolled-up top and bottom edge. The word "Conclusion" is written in white, bold, sans-serif font, centered on the scroll.

# Conclusion

- Les ferments d'une levure boulangère et d'un levain naturel ne sont pas les mêmes : **la levure de boulangerie donne une fermentation alcoolique rapide, le levain naturel une fermentation lactique plus lente et plus digeste.**
- Le pain au levain possède une **meilleure valeur nutritionnelle**
- La fermentation au levain est donc bien préférable pour les pains à base de céréales complètes.



## ***Immobilisation des enzymes et leur application***

# **Plan de travail**

## **Introduction**

- 1. Définitions**
- 2. Différents procédés d'immobilisation des enzymes**
  - **Immobilisation par adsorption**
  - **Immobilisation par la liaison covalente**
  - **Immobilisation par inclusion**
- 3. Application des enzymes**
- 4. Raisons d'utilisation des enzymes**

## **Conclusion**



# Introduction

- Les différents organismes produisent une large variété d'enzymes hydrolytiques spécifiques aux différents substrats qui sont très répandus dans la nature.
- Les enzymes jouent un rôle central dans le monde vivant (dans la lutte biologique contre les infections fongiques).
- Depuis la seconde moitié du siècle dernier, de nombreux efforts ont été consacrés au développement d'enzymes immobilisés pour une variété d'applications.
- La technique d'immobilisation des enzymes est utilisée industriellement depuis plus de 25 ans. Au cours de ces années ; le nombre d'enzymes connues a considérablement augmenté et leurs applications sont multiples :
  - Chimie analytique.
  - Pharmacologie .
  - Toxicologie .
  - Les industries agro-alimentaires .
  - Le secteur biomédical.



# 1-Définitions

## Enzyme

sont des protéines qui jouent un rôle fondamentale dans le mode de fonctionnement des systèmes vivants, la connaissance de leurs structures et de leurs fonctions a permis notamment de mieux comprendre le métabolisme cellulaire, leurs rôle biologique est de catalyser les différentes réactions de transformation qui se produisent dans les organes.

## Enzyme de la transformation alimentaire

Enzyme employée pour contrôler la texture, le goût, l'aspect ou la valeur nutritive des aliments .

## Un catalyseur

une espèce chimique qui permet d'augmenter la vitesse d'une réaction mais qui n'apparaît pas dans l'équation de cette réaction, Il existe trois types de catalyses: la catalyse hétérogène, la catalyse homogène et la catalyse enzymatique.

## 2- Les différents procédés d'immobilisation des enzymes

La fixation des enzymes sur un support rappelle leur fonctionnement *in vivo*, dans son milieu biologique l'enzyme agit le plus souvent fixée sur une membrane. La fixation des enzymes est un moyen utilisé en biotechnologie pour diminuer le coût des opérations de bioconversion en permettant une utilisation répétée ou continuée des enzymes.

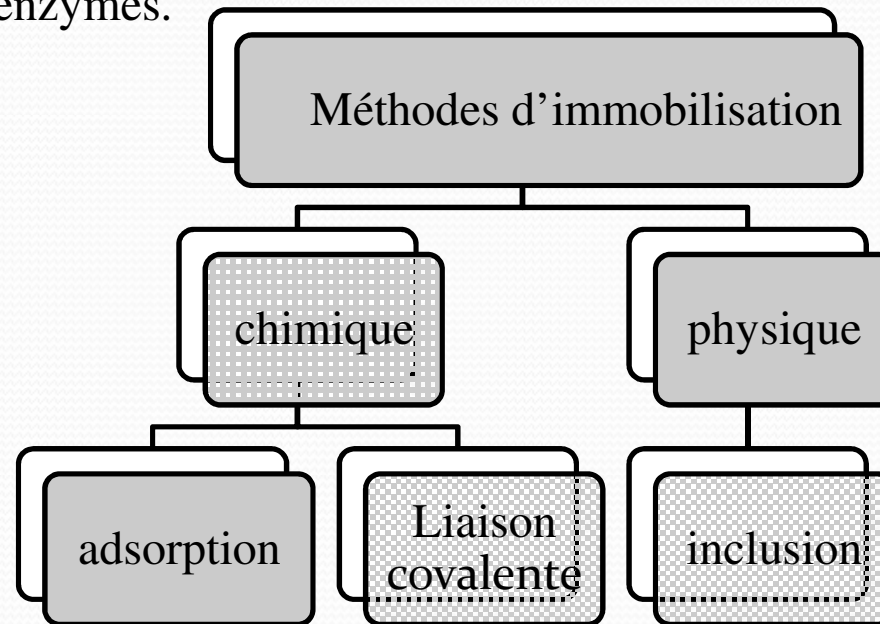
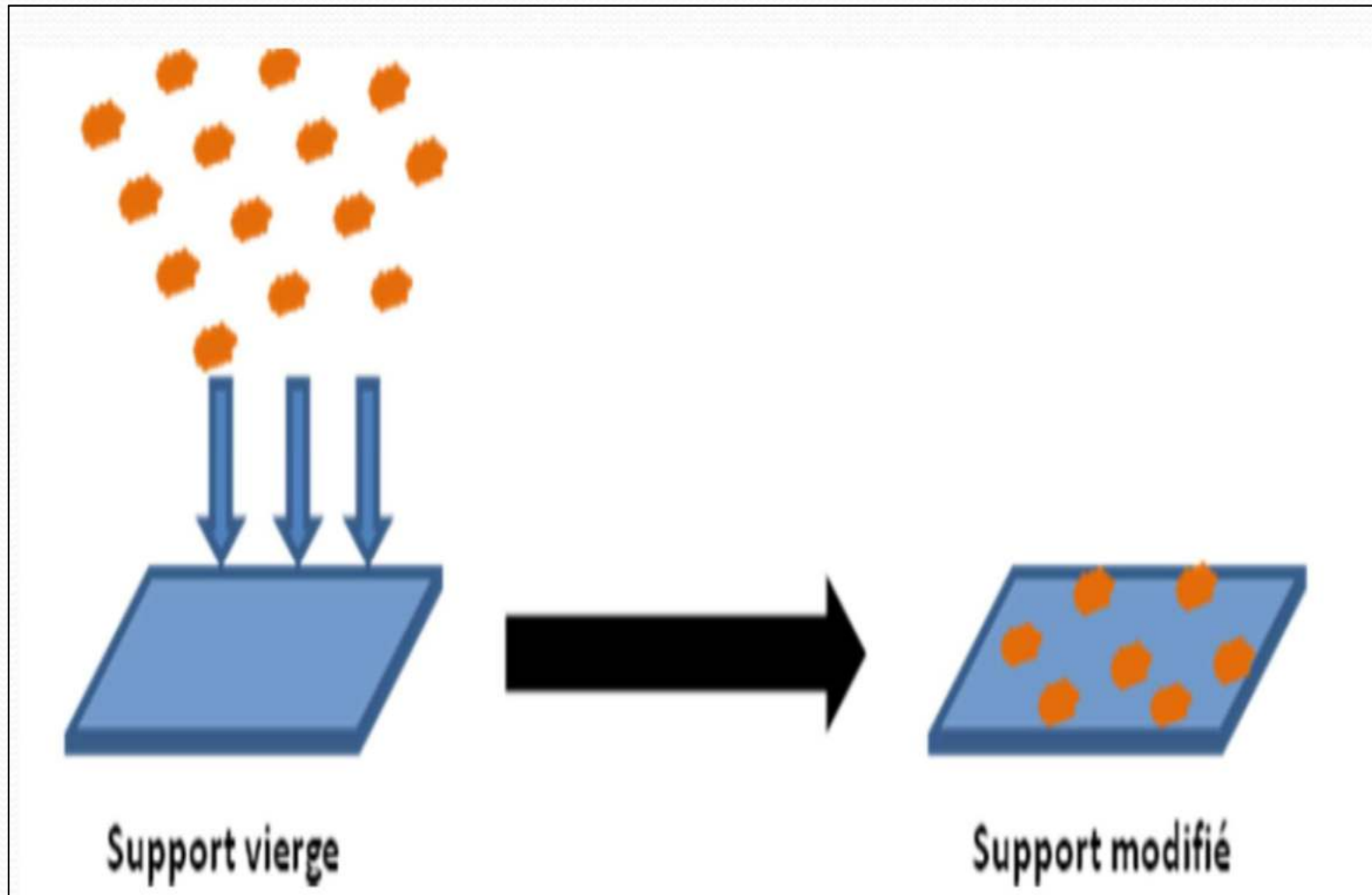


Figure n°1: les différentes méthodes d'immobilisation.

## ➤ IMMOBILISATION PAR ADSORPTION



**Figure n°2 : Adsorption des enzymes sur un support.**



## Avantages et inconvénients des méthodes d'immobilisation par adsorption

AVANTAGES	INCONVÉNIENTS
<p>1 - cette méthode se caractérise par sa très grande facilité de mise en œuvre :</p> <ul style="list-style-type: none"><li>* il suffit de mettre en contact le support et l'enzyme pour effectuer l'adsorption.</li><li>* aucune réaction chimique n'intervient.</li></ul> <p>2 - il est possible de régénérer les complexes enzymes-suppports, si l'enzyme perd son activité en cours de fonctionnement, il est possible de la désorbée et de la remplacer par une préparation active.</p>	<p>- la capacité d'adsorption étant directement liée à l'aire disponible, les adsorbants se présentent souvent sous une forme extrêmement divisée. Ceci peut poser des problèmes de mise en œuvre en réaction continu (pertes de charge, colmatage,...).</p>

## ➤ IMMOBILISATION PAR LA LIAISON COVALENTE

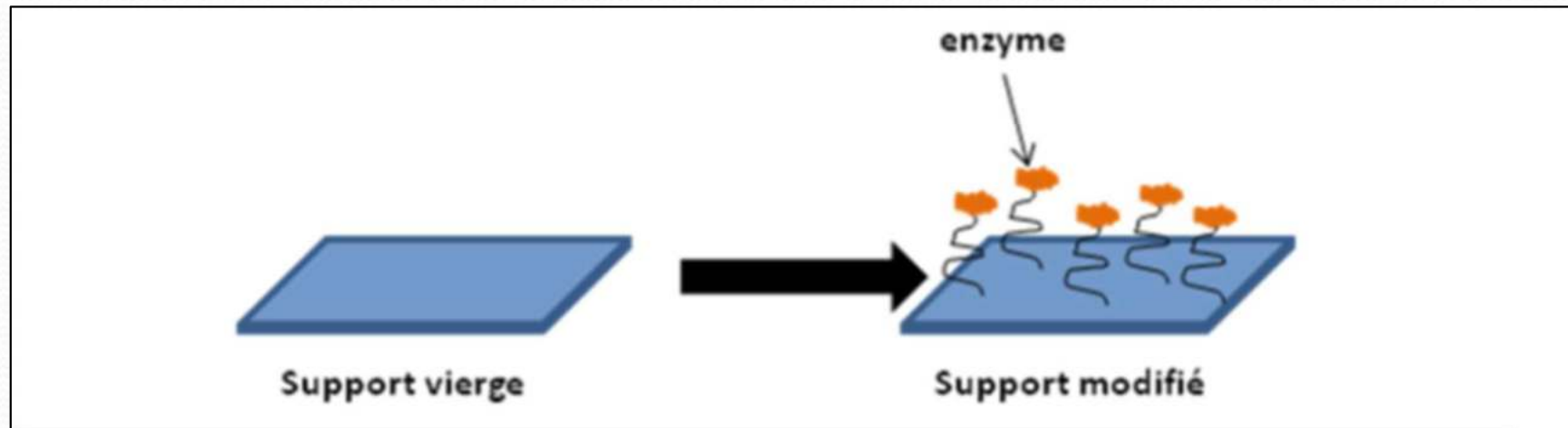


Figure n°3 : liaison covalent avec le support.

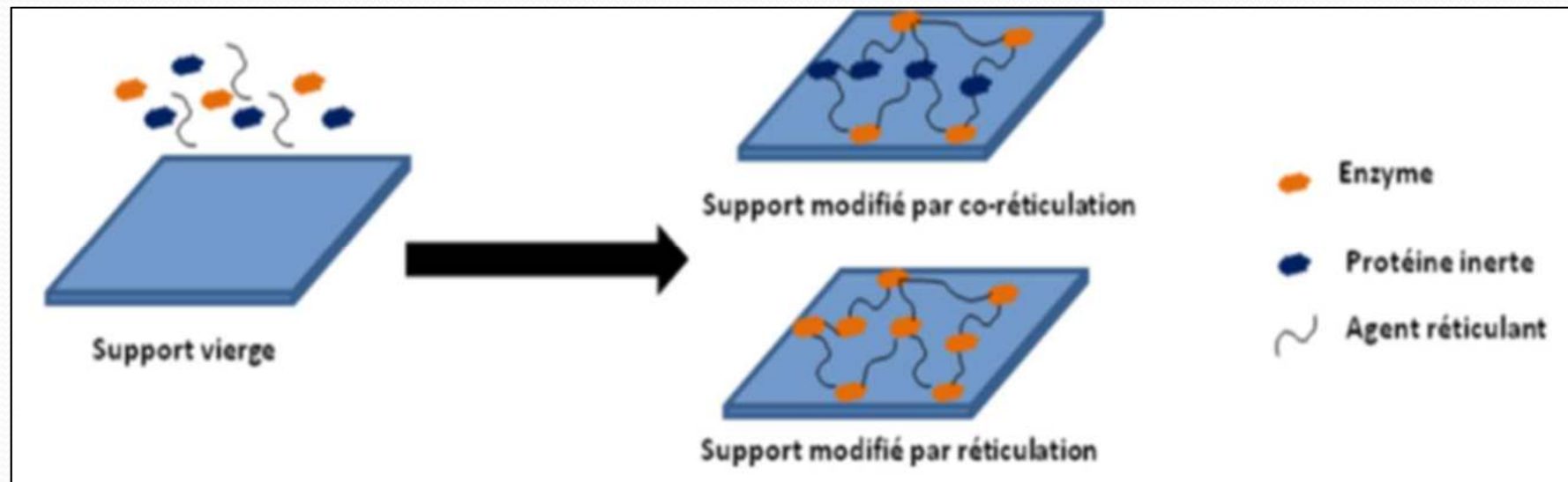


Figure n°4 : réticulation et co-réticulation des enzymes.



## Avantages et inconvénients

### Avantage

- La Solidité de la liaison Enzyme-Support obtenue.
- La Possibilité d'obtenir des dérivés résistant parfaitement à des variations importantes de condition de milieu (**pH, Force Ionique**) et en particulier à des lavages répétés par des solutions concentrées de chlorure de sodiums.
- Une Grande variété de supports et de méthodes d'activation.
- Établissement de liaison covalentes entre la molécule d'enzyme et le support ➡ Rigidification de la structure de l'enzyme ➡ une perte d'efficacité car un certains degré de plasticité est nécessaire au bon fonctionnement de l'enzyme .

## Inconvénients

- Immobilisation des enzymes par liaison covalente
- Une modification importante de la structure de l'enzyme
- Une diminution de l'efficacité de l'immobilisation.
- La quantité d'enzyme immobilisée par gramme de support sont en général **plus faible** dans le cas du greffage covalent que dans celui de l'inclusion ou de l'adsorption.

Fait appel

suite de  
Réactions plus  
complexe

## ➤ IMMOBILISATION PAR INCLUSION

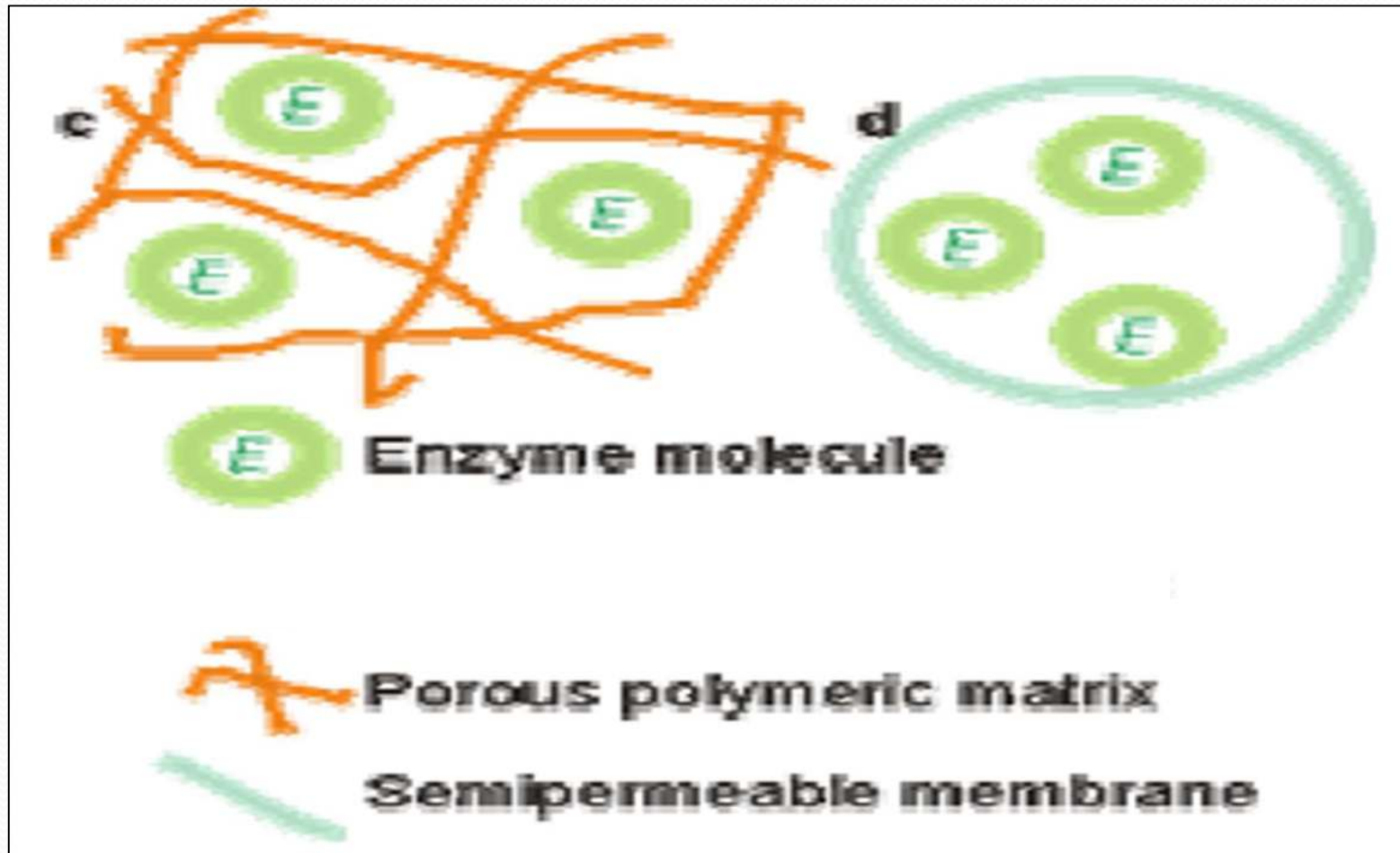


Figure n°5 : inclusion des enzymes.



## Avantages et inconvénients des méthodes d'immobilisation par inclusion

### Avantages + + +

- ✓ Les réactions de polymérisation ou de gélification sont des réactions bien maîtrisées et les réactifs impliqués sont des réactifs d'emploi classique soit au niveau du laboratoire soit au niveau industriel.
- ✓ L'inclusion permet en une seule étape d'immobiliser la totalité de la masse d'enzyme mise en jeu. Il ne s'établit aucun lien l'enzyme et le polymère, ce qui limite les risques de dénaturation résultant de l'immobilisation.

### Inconvénients — — —

- ✓ Les conditions de polymérisation, notamment dans le cas des polymères vinyliques, peuvent s'avérer dénaturantes pour l'enzyme.
- ✓ Les propriétés mécaniques des gels sont souvent mauvaises, du moins insuffisantes, pour envisager une utilisation en réacteur à lit fixe de taille importante.



## **4 - APPLICATION DES ENZYMES**




Application	Enzymes utilisées	Utilisations
Traitement de la nourriture	Amylases fongiques et de plantes	<p>Production de sucres à partir d'amidon : fabrication de sirops.</p> <p>Boulangerie : fermentation de sucres par les levures pour produire le dioxyde de carbone qui lève la pâte.</p>
	protéases	<p>Les fabricants de biscuit les utilisent pour baisser la teneur en protéines de la farine.</p> <p>Prédigestion des aliments pour bébés.</p>
	Cellulases, pectinases	Clarification des jus de fruit.
	papaine	Attendrit la viande pour la cuisson.

Application	Enzymes utilisées	Utilisations
Brasserie	Les enzymes de l'orge sont libérées pendant le stade d'écrasement lors de la fabrication de la bière.	Elles dégradent l'amidon et les protéines pour produire des sucres simples, des acides aminés et des peptides utilisés par la levure pour la fermentation.
	Enzymes d'orge produites industriellement :	<p>Largement utilisée dans le brassage pour remplacer les enzymes naturelles de l'orge.</p> <p>Découpent les polysaccharides et les protéines du malt.</p> <p>Améliorent les caractéristiques du moût ("<i>wort</i> ") et la filtration de la bière.</p> <p>Bière de faible calorie et ajustage de la fermentabilité.</p> <p>Enlèvent le trouble produit pendant l'entreposage de la bière.</p> <p>Augmente l'efficacité de la fermentation en réduisant la formation de Diacétyl.</p>

Application	Enzymes utilisées	Utilisations
Industrie laitière	<p>Présure extraite de l'estomac de jeunes animaux ruminants (exemple : veaux, agneaux)</p> <p>Enzymes produites par voie microbienne</p> <p>Lipases</p> <p>lactases</p>	<p>Hydrolyse des protéines lors de la fabrication de fromage.</p> <p>Utilisation croissante dans l'industrie laitière.</p>
Industrie de l'amidon	<p>amylases, amyloglucosidases et glucoamylases</p> <p>Glucose isomérase</p>	<p>Convertissent l'amidon en glucose et différents sirops.</p> <p>Convertit le glucose en fructose pour produire des sirops à partir de féculents. Ces sirops ont des propriétés adoucissantes et des valeurs calorifiques plus basses que le saccharose pour le même niveau de douceur.</p>

Application	Enzymes utilisées	Utilisations
Industrie du papier	Amylases, xylanases, cellulases et ligninases	<p>Hydrolysent l'amidon pour baisser la viscosité du papier et aider à sa découpe et à son surfaçage.</p> <p>Les xylanases réduisent la quantité d'agents chimiques nécessaires au blanchiment; les cellulases lissent les fibres, améliorent le drainage de l'eau et facilitent l'enlèvement de l'encre; les ligninases hydrolysent la lignine pour adoucir le papier.</p>
Industrie du carburant biologique	Cellulases et ligninases	<p>Hydrolyse de la cellulose dans les sucres fermentables lors de la production d'éthanol à partir de la cellulose.</p> <p>Récupération des résidus de lignine</p>



application	Enzymes utilisées	utilisations
Détergents biologiques	Protéases excrétées par les bactéries Amylases Lipases Cellulases	Pré-trempage et applications liquides directes pour enlever les taches des vêtements d'origine protéique. Détergents pour enlever les résidus d'amidon résistants. Utilisé pour enlever les taches grasses et huileuses. Utilisé dans les adoucissants biologiques.



## 5 - Raisons d'utilisation des enzymes

- Accélération et régularisation des phénomènes enzymatiques, exemple (régulariser la panification industrielle) .
- Amélioration de la qualité du produit fabriqué.
- Réalisation de produits nouveaux.
- Régularisation des prix sur le marché.



## **Conclusion**

L'utilisation des enzymes dans divers domaines industriels présente donc un fort intérêt et explique les efforts faites ces dernières années par la communauté scientifique dans ce sens. Cependant, elles restent des entités faisant partie du domaine du vivant et leur emploi nécessite de prendre certaines précautions afin de conserver leurs propriétés catalytiques. De plus, chaque enzyme présente des particularités, il n'existe pas de solution universelle applicable à l'ensemble de cette classe de protéines.